

Renata Cristina Nunes Marchette

**AVALIAÇÃO TEMPORAL DOS EFEITOS DO ESTRESSE
DE CONTENÇÃO NO FRIO SOBRE OS
COMPORTAMENTOS RELACIONADOS A ANSIEDADE E
DEPRESSÃO EM DUAS LINHAGENS DE CAMUNDONGOS
FÊMEAS, *Swiss* e C57BL/6J**

Dissertação submetida ao
Programa de Farmacologia da
Universidade Federal de Santa
Catarina como requisito parcial
para a obtenção do Grau de
Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Thereza
Christina Monteiro de Lima

Florianópolis
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Marchette, Renata Cristina Nunes

Avaliação temporal dos efeitos do estresse de contenção no frio sobre os comportamentos relacionados a ansiedade e depressão em duas linhagens de camundongos fêmeas, Swiss e C57BL/6J / Renata Cristina Nunes Marchette ; orientadora, Thereza Christina Monteiro de Lima - Florianópolis, SC, 2013.

80 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Estresse. 3. Diferença entre linhagens. 4. Ansiedade. 5. Depressão. I. Lima, Thereza Christina Monteiro de. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Considerando este trabalho como mais uma etapa de uma longa jornada, agradecer não é fácil, pois esta caminhada não começou aqui e todos os que passaram pela minha vida de alguma maneira influenciaram e contribuíram para este trabalho pudesse ser realizado.

Agradeço especialmente:

A meus pais, Valdir e Terezinha, sem os quais nada seria possível. Por seu amor, apoio, sustento, por não medirem esforços para que eu chegasse até aqui e por compreenderem que eu precisava seguir meu sonho mesmo isso significando 1000 km de distância.

À minha irmã, Juliana (Dudu), por me amar e ‘aturar’ desde sempre. E por ser a pessoa que sempre me ajuda a por tudo em perspectiva e encontrar o melhor ângulo. “I carry your heart (I carry it in my heart) too.”

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Thereza Christina Monteiro de Lima, primeiramente por ter me aceitado em seu laboratório, mas principalmente pelos dois anos de convívio, orientação, que foi muito além deste trabalho e, acima de tudo, pela confiança no meu trabalho. Muito obrigada.

Aos professores André Báfica, André Ramos e Reinaldo Takahashi por me julgarem apta a entrar neste programa.

Aos membros da banca examinadora, professores Geizon Izídio, Ricardo Luiz Nunes de Souza e Reinaldo Takahashi por suas valiosas sugestões e o tempo dispensado na correção e avaliação deste trabalho.

Aos meus amigos de laboratório Alanny, Alexandre, Andressa, Ana Paula, Claudini, Evelyn, Gilliard, Júlia, Leonardo, Lorena, Marcelo, Nayana, Pablinny, e nossos agregados oficiais, Filipe e Máira, por viverem o ônus e o bônus da vida acadêmica comigo nestes dois anos.

À minha turma de mestrado Amanda, Ana Kelly, Fernanda, Flora, Karina, Leonardo, Lívia, Marília, Patrícia, Sandro e Vagner.

Às minhas 'ICs maravilhas' Claudini, Júlia e Nayana por estarem dispostas a me ajudar mesmo nos finais de semana e feriados e me ensinar a definição pura de uma pessoa "querida". Muito obrigada meninas.

À minha família 'mané' Amanda, Claudini, Flora, Marília e Vagner pela paciência, carinho, suporte e companheirismo. Amo vocês!

Aos meus amigos que mesmo a distância se fazem presentes, e são fundamentais na minha vida: Ana Carolina, Bruno, Fabiano, Felipe, Frederico, Gabriel 'Zinho', Gustavo, Isabela, Jacqueline, Juliana, Lucas, Lucas 'Ceará', Nathalia, Paola, Rafael 'Mobília', Tiago e Vinícius 'Chico'.

Ao professor Jamil e seus alunos pelo apoio na realização deste trabalho e por sempre estarem disponíveis para uma troca de ideias.

Aos demais professores, alunos e funcionários do Departamento de Farmacologia, por serem parte fundamental do cotidiano.

Aos animais que são fundamentais para o avanço da ciência.

À CAPES e ao CNPq pelo auxílio financeiro.

*“Um homem precisa viajar para lugares que não
conhece para quebrar essa arrogância que nos faz
ver o mundo como imaginamos, e não simplesmente
como é ou pode ser; que nos faz professores e
doutores do que não vimos, quando deveríamos ser
alunos, e simplesmente ir ver.”*

Amyr Klink – Mar sem fim

RESUMO

A resposta de estresse tem valor adaptativo na sobrevivência das espécies, porém quando há uma falha na regulação destas respostas ou uma incapacidade do organismo em se adaptar, as respostas fisiológicas se tornam exacerbadas e causam prejuízos ao organismo, assim como ocorre quando há persistência do estressor por um período prolongado. Essa falha na regulação da resposta de estresse pode se manifestar sistemicamente (úlceras gástricas, supressão imunológica, etc) ou no âmbito comportamental, onde pode causar ou desencadear transtornos ansiosos, depressivos e de dependência. Fatores individuais também influenciam a resposta ao estressor, entre eles a idade, o sexo e fatores genéticos, sendo que mulheres são mais propensas a desenvolver transtornos relacionados ao estresse. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar as influências genéticas e da persistência de um estressor sobre as respostas comportamentais de camundongos. Fêmeas de três meses de idade das linhagens heterogênica *Swiss* e isogênica C57BL/6J (B6) foram submetidas a seis protocolos de estresse por contenção no frio, sendo três agudos (30 min, uma, seis ou 24h antes do teste comportamental) e três repetidos (3, 10 e 21 dias). Após o período indicado no estresse agudo os animais foram avaliados no teste de sobressalto acústico. Após os protocolos de estresse repetido os animais foram avaliados nos seguintes testes: sobressalto acústico, labirinto em cruz elevado (LCE), e consumo de sacarose. O comportamento dos animais não estressados (*naïve*) diferiu entre as linhagens em todos os testes, conforme o esperado, indicando a influência de fatores genéticos nos comportamentos

observados. Também observamos a influência de fatores genéticos nos animais submetidos ao estresse, sendo que a linhagem B6 apresentou alterações comportamentais em todos os testes realizados, mas somente no protocolo de 21 dias. Já a linhagem *Swiss* apresentou uma redução na resposta de sobressalto acústico após o protocolo de estresse agudo 1h antes do teste. Esses resultados indicam a importância de fatores genéticos nos comportamentos relacionados à ansiedade e à depressão na presença ou ausência de um estressor. Sugerimos ainda que a comparação entre dados presentes na literatura deve sempre observar a linhagem utilizada, assim como a determinação da linhagem a ser utilizada deve levar em consideração o objetivo do estudo em questão.

Palavras-chave: Estresse; Camundongos; Fêmeas;
Swiss; C57BL/6J

ABSTRACT

The stress response has an adaptative value on the species survival. However, when there is a failure on the regulation of these responses or an impaired coping, the physiological responses become overstated and cause damage to the body, as well as when there is a persistence of the stressor. This failure on the regulation of stress response can result in systemic injuries (peptic ulcers, immunological suppression, for example) or behavioral impairments, leading to anxiety, mood disorders and drug addiction. Individual features such as age, sex and genetic background can bias the stress response, being women more likely to develop stress-related diseases. Therefore, the aim of this study was to evaluate the influence of genetic background and stressor endurance on mice behavior. To reach this aim 3-months old outbred Swiss and inbred C57BL/6J female mice underwent 6 cold restraint stress protocols, being 3 acute (1, 6 and 24h prior the test) and 3 repeated (3, 10 and 21 days). Afterwards, the animals were exposed to the acoustic startle response, elevated plus maze and sucrose consumption tests. The behavior of naive animals differed in all tests indicating a genetic background control of these behaviors. When animals were exposed to the 21 days repeated protocol, C57BL/6J mice displayed behavior alterations in all of the tests whereas Swiss mice showed a reduction of the startle response after the 1h acute stress protocol. These results indicate the genetic background importance on anxiety and depression-related response, in the presence or absence of a stressor. It also suggests that a special attention must be given to the strain used when

comparing results presented in literature and the choice of which strain use in a future work should take in account its goal.

Keywords: Stress; Mice; Female; *Swiss*; C57BL/6J

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática da resposta fisiológica rápida ao estresse.....	27
Figura 2: Esquema representativo da secreção circadiana de corticosteroides e do pico de secreção em resposta ao estresse	28
Figura 3: Mecanismo de <i>feedback</i> negativo do eixo HPA.....	29
Figura 4: Perfil temporal da ação dos principais mediadores na resposta ao estresse.....	30
Figura 5: Variação citológica e hormonal ao longo do ciclo estral.....	38
Figura 6: Esquema representativo do teste de preferência por sacarose.....	45
Figura 7: Esquema dos experimentos de estresse agudo.....	46
Figura 8: Esquema do protocolo experimental do estresse repetido por três dias.....	47
Figura 9: Esquema dos experimentos de estresse repetido 10 dias.....	47
Figura 10: Esquema dos procedimentos no estresse repetido por 21 dias.....	48
Figura 11: Análise da resposta de sobressalto acústico em camundongos fêmeas utilizando a linhagem como variável independente (Swiss vs C57BL/6J) e as diferentes intensidades de estímulo como fator de repetição.....	51
Figura 12: Respostas de sobressalto de camundongos C57BL/6J e <i>Swiss</i> fêmeas analisadas de acordo com a fase do ciclo estral.....	52
Figura 13: Efeito do ciclo estral sobre a resposta de sobressalto em fêmeas da linhagem C57BL/6J e <i>Swiss</i> a uma intensidade de estímulo.....	53

Figura 14: Efeito dos diferentes protocolos de estresse sobre a resposta de sobressalto de camundongos C57BL/6J fêmeas.....	53
Figura 15: Efeito do estresse agudo sobre a resposta de sobressalto de camundongos C57BL/6J fêmeas de acordo com a fase do ciclo estral.....	54
Figura 16: Efeito dos diferentes protocolos de estresse sobre a resposta de sobressalto de camundongos <i>Swiss</i> fêmeas.....	55
Figura 17: Diferença entre camundongos fêmeas das linhagens C57BL/6J e <i>Swiss</i> nas medidas espaço-temporais do labirinto em elevado.....	56
Figura 18: Frequência de entradas nos braços fechados de camundongos fêmeas das linhagens C57BL/6J e <i>Swiss</i>	56
Figura 19: Frequência de execução e duração dos comportamentos de avaliação de risco de camundongos fêmeas das linhagens C57BL/6J e <i>Swiss</i>	57
Figura 20: Efeitos dos protocolos de estresse repetido sobre as entradas nos braços abertos do LCE de camundongos fêmeas das linhagens <i>Swiss</i> e C57BL/6J.....	58
Figura 21: Efeitos dos protocolos de estresse repetido sobre o tempo de permanência nos braços abertos do LCE de camundongos fêmeas das linhagens <i>Swiss</i> e C57BL/6J.....	59
Figura 22: Efeitos dos protocolos de estresse repetido sobre a frequência de execução dos comportamentos de avaliação de risco camundongos fêmeas das linhagens <i>Swiss</i> e C57BL/6J expostos ao labirinto em cruz elevado.....	60
Figura 23: Efeitos dos protocolos de estresse repetido sobre a frequência de entradas nos braços fechados de	

camundongos fêmeas das linhagens <i>Swiss</i> e C57BL/6J expostos ao labirinto em cruz elevado.....	61
Figura 24: Preferência por uma solução de sacarose de camundongos <i>naïve</i> C57BL/6J e <i>Swiss</i> fêmeas.....	65
Figura 25: Efeito do estresse repetido 10 e 21 dias sobre a preferência por uma solução de sacarose 0,8% sobre água em camundongos C57BL/6J e <i>Swiss</i> fêmeas.....	65
Figura 26: Concentração de corticosterona plasmática (ng/mL) de camundongos fêmeas das linhagens <i>Swiss</i> e C57BL/6J submetidas aos diferentes protocolos de estresse.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Prevalência de transtornos ansiosos e depressivos ao longo da vida nos EUA.....	33
Tabela 2: Prevalência de transtornos ansiosos, depressivos e dependência ao longo da vida no Brasil (grande São Paulo).....	33
Tabela 3: Parâmetros etológicos avaliados no labirinto em cruz elevado em camundongos fêmeas <i>Swiss</i> após os protocolos de estresse repetido por 3, 10 e 21 dias.....	62
Tabela 4: Parâmetros etológicos avaliados no labirinto em cruz elevado em camundongos fêmeas C57BL/6J após os protocolos de estresse repetido por 3, 10 e 21 dias.....	64

LISTA DE ABREVIações

AA: Alta atividade
ACTH: Corticotropina
AR: Avaliação de risco
AVP: Vasopressina
BA: Baixa atividade
BDNF: do inglês *brain-derived neurotrophic factor*
CRH: Hormônio liberador de corticotropina
CS: Consumo de sacarose
DSM: do inglês *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*
EBA: Entradas nos braços abertos
EBF: Entradas nos braços fechados
EExBA: Entradas na extremidade dos braços abertos
ExBA: Extremidade do braço aberto
GABA: Ácido gama-aminobutírico
GR: glicocorticóide
GROO-f: frequência de *grooming*
GROO-d: duração do *grooming*
HD: *Head dipping* ou mergulhos de cabeça
HPA: eixo hipotálamo-pituitária-adrenal
LCE: Labirinto em cruz elevado
MR: mineralocorticóide
OMS: Organização Mundial da Saúde
PVN: Núcleo paraventricular do hipotálamo
QTLs : do inglês *quantitative trait loci*
R: *Rearing* ou levantamento
SA: Sobressalto acústico
SAP-d: Duração dos comportamentos de avaliação de risco
SC: Teste da suspensão pela cauda
SNAs : Sistema nervoso autônomo simpático
STX: estresse
TBA: Tempo nos braços abertos

TBF: Tempo nos braços fechados

TC: Tempo na plataforma central

TEPT: Transtorno de estresse pós-traumático

TExBA: Tempo na extremidade dos braços abertos

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	27
1.1. CLASSIFICAÇÃO DOS TRANSTORNOS RELACIONADOS AO ESTRESSE.....	31
1.2. PREVALÊNCIA.....	32
1.3. MODELOS ANIMAIS.....	35
1.3.1. Linhagens.....	36
1.3.2. Diferenças comportamentais relacionadas ao ciclo estral.....	37
1.4. HIPÓTESE.....	38
1.5. JUSTIFICATIVA.....	38
2. OBJETIVOS.....	39
2.1. OBJETIVO GERAL.....	39
2.1.1. Objetivos Específicos.....	39
3. METODOLOGIA.....	41
3.1. ANIMAIS.....	41
3.1.1. Considerações éticas.....	42
3.2. TESTES COMPORTAMENTAIS.....	42
3.2.1. Sobressalto acústico.....	42
3.2.1.1. Procedimento experimental.....	42
3.2.2. Labirinto em cruz elevado.....	43
3.2.3. Preferência por sacarose.....	44
3.3. ESTRESSE POR CONTENÇÃO NO FRIO.....	45
3.3.1. Protocolos.....	45
3.3.1.1. Estresse agudo.....	45
3.3.1.2. Estresse repetido três dias.....	46
3.3.1.3. Estresse repetido 10 dias.....	47
3.3.1.4. Estresse repetido por 21 dias.....	47

3.4. VERIFICAÇÃO DO CICLO ESTRAL.....	48
3.5. ANÁLISE DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE CORTICOSTERONA.....	48
3.5.1. Obtenção das amostras para o ensaio..	48
3.5.2. Dosagem.....	49
3.5.3. Conversão de dados.....	49
3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	49
4. RESULTADOS.....	51
4.1. SOBRESSALTO ACÚSTICO.....	51
4.2. LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO.....	55
4.3. CONSUMO DE SACAROSE.....	65
4.4. CORTICOSTERONA PLASMÁTICA.....	66
5. DISCUSSÃO.....	67
6. CONCLUSÕES.....	77
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79

1 INTRODUÇÃO

O termo estresse foi emprestado da engenharia, em 1936, pelo endocrinologista húngaro Hans Selye. Atualmente este termo é amplamente usado, muitas vezes com significados diferentes. Por exemplo, para algumas pessoas reflete um estado de fadiga crônica, preocupação e uma incapacidade de lidar com a situação (*coping*), enquanto para outras pode significar desafio e entusiasmo (McEWEN, 2005).

A resposta fisiológica rápida ao estresse envolve a ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), que resulta na liberação de corticosteroides pelo córtex da glândula adrenal, e do sistema nervoso autônomo simpático (SNAS), resultando na liberação de noradrenalina pelas terminações nervosas e adrenalina pela medula da glândula adrenal (Figura 1). A ativação desses dois sistemas envolve a participação de três classes de mediadores: monoaminas, neuropeptídeos e corticosteróides (KLOET; JOËLS; HOLLSBOER, 2005; ULRICH-LAI; HERMAN, 2009).

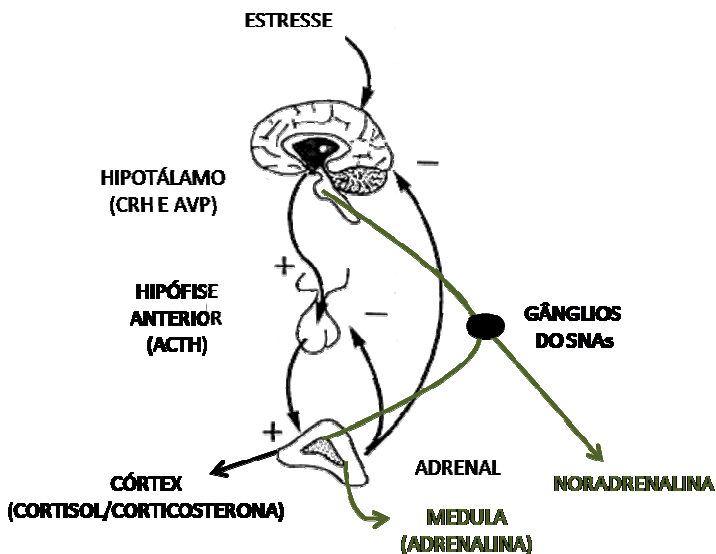


Figura 5: Representação esquemática da resposta fisiológica rápida ao estresse. Sistema nervoso autônomo simpático (SNAS), e eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA). CRH, hormônio liberador de corticotropina; AVP, vasopressina; ACTH, corticotropina. Baseado em ULRICH-LAI; HERMAN (2009) e adaptado de <http://www.cns.med.ucla.edu>.

Logo após um evento estressor os níveis de monoaminas, noradrenalina, dopamina e serotonina, por exemplo, se elevam rapidamente (minutos) em diversas estruturas encefálicas, principalmente as do sistema límbico. Esta elevação raramente ultrapassa a duração da exposição ao estressor (JOËLS; BARAM, 2009).

Diversos neuropeptídeos são liberados por populações específicas de neurônios durante a resposta de estresse, entre eles o CRH e as urocortinas 1, 2 e 3, a vasopressina, a orexina e a dinorfina, e suas ações estão relacionadas principalmente à memória e à ansiedade (CARRASCO; VAN DE KAR, 2003).

Os corticosteróides são secretados de maneira circadiana, apresentando um pico no início da fase ativa (manhã em seres humanos e noite em roedores) e um decaimento dos níveis plasmáticos ao longo do dia (HERMAN et al., 2005). Um estressor provoca um pico de liberação desses hormônios que se sobrepõe ao ritmo circadiano (JOËLS; BARAM, 2009), como mostrado na figura 2.

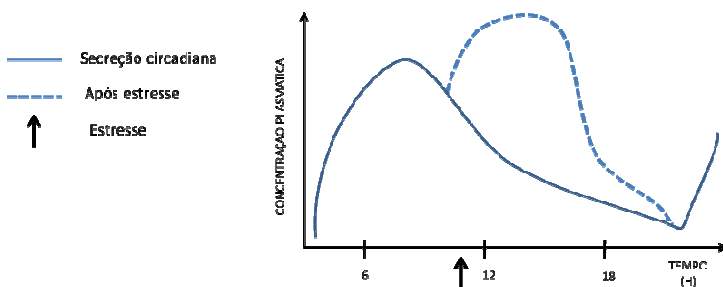


Figura 6: Esquema representativo da secreção circadiana de corticosteróides e do pico de secreção em resposta ao estresse. Baseado em HERMAN et al. (2005) e JOËLS; BARAM (2009).

Os principais corticosteróides são o cortisol em humanos e a corticosterona em roedores. Estes hormônios exercem seus efeitos através de seus dois receptores, o mineralocorticóide (MR) e o glicocorticóide (GR) (HERMAN et al., 2005). Após a ligação do hormônio a um dos receptores, este complexo é internalizado e translocado para o núcleo celular onde exercerá efeitos sobre a transcrição gênica (JOËLS; BARAM, 2009). Estes hormônios podem atuar em todo o encéfalo e, também, no próprio eixo HPA, onde inibem a síntese de

CRH e vasopressina no hipotálamo e a de ACTH na pituitária anterior, como ilustrado na figura 3, atuando como um mecanismo de *feedback* negativo que irá encerrar a reação ao estressor (KLOET; JOËLS; HOLSBOER, 2005). Assim, os corticosteroides atuam em seu próprio eixo de liberação diminuindo sua ativação e encerrando a resposta de estresse.

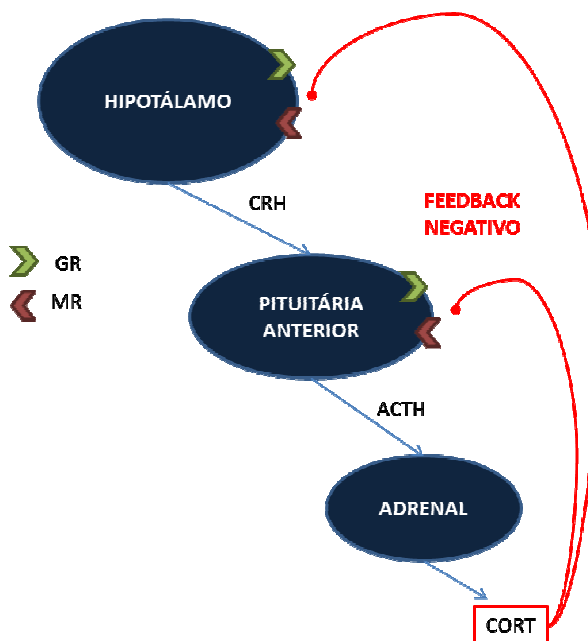


Figura 7: Mecanismo de *feedback* negativo do eixo HPA. GR, receptor glicocorticoide; MR, receptor mineralocorticoide; CORT, corticosteróides (baseado em DE KLOET; JOËLS; HOLSBOER, 2005).

A diversidade temporal e espacial das ações dos principais mediadores da resposta de estresse permite ao mesmo tempo a coordenação de seus efeitos e o desenvolvimento de uma cadeia de eventos onde as respostas rápidas provocadas pelas monoaminas promovem a tomada de decisão e sobrevivência à curto prazo, enquanto o armazenamento de informações provocado pelos corticosteróides é importante à longo prazo, no caso do indivíduo se deparar com uma situação semelhante no futuro. Este perfil temporal

da resposta a um estressor pode ser representado esquematicamente em três domínios temporais, um rápido (segundos a minutos), um intermediário (minutos a horas) e um prolongado (horas até meses). E cada tipo de mediador poderia exercer efeitos em todos estes domínios por mecanismos celulares distintos (JOËLS; BARAM, 2009).

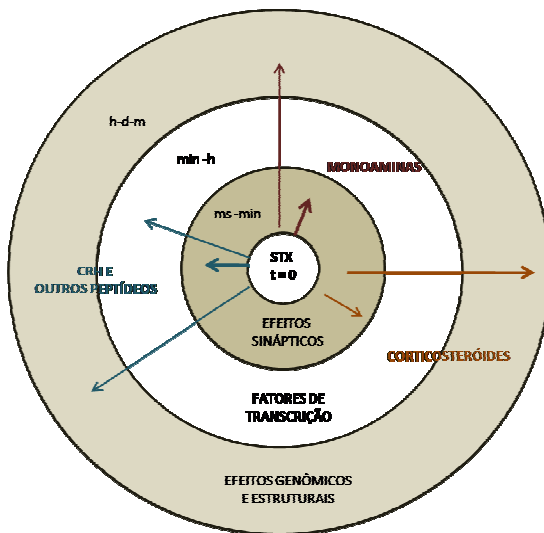


Figura 8: Perfil temporal da ação dos principais mediadores na resposta ao estresse. O comprimento dos vetores corresponde à faixa temporal em que esta ação ocorre. Os principais efeitos das monoaminas e dos peptídeos são efeitos sinápticos rápidos, enquanto os efeitos dos corticosteróides são efeitos genômicos tardios, como descrito classicamente nas duas fases da resposta ao estresse. No entanto, corticosteróides podem ter efeitos rápidos quando atuam em MRs localizados nas membranas, e peptídeos e monoaminas podem ter efeitos tardios através da regulação de fatores de transcrição que podem levar a alterações genômicas sustentadas. STX, estresse (adaptado de JOËLS; BARAM, 2009).

O recrutamento rápido destes mediadores associado ao encerramento eficiente das respostas fisiológicas a um estressor, quando não mais necessárias, caracterizam um *coping* efetivo. A falha nessa regulação leva a um *coping* inefetivo, originando diversos eventos que irão resultar em um estado duradouro de ‘perigo’

caracterizado por uma resposta desproporcional do eixo HPA e uma resposta alterada do sistema límbico (KLOET; JOËLS; HOLSBOER, 2005).

McEwen e colaboradores definem esse processo ativo para manter a estabilidade fisiológica e comportamental durante períodos de mudança como alostase. Se este processo for insuficiente ou mal organizado, pode induzir ao recrutamento tardio da resposta ao estresse e levar a uma sobrecarga alostática (KARATSOREOS; McEWEN, 2011). Esta sobrecarga alostática não tem um propósito útil ao organismo e predispõe o indivíduo a doenças (McEWEN, 2005).

1.1 CLASSIFICAÇÃO DOS TRANSTORNOS RELACIONADOS AO ESTRESSE

A psicopatologia estabelece que sensações de estresse, ansiedade, depressão e excitação possuem muito em comum e sua distinção depende do grau de eficiência do indivíduo em lidar com a situação desafiadora, isto é, o *coping* (BARLOW; DURAND, 2008). Os diferentes transtornos resultantes da falha na regulação das respostas fisiológica ao estresse são agrupados por dois sistemas de classificação de doenças internacionais principais, o CID-10 e o DSM-IV.

A Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados com a Saúde da Organização Mundial da Saúde (OMS), mais conhecida por sua sigla CID-10, foi aprovada em 1990 e entrou em uso em 1994 (a décima primeira edição está em preparação e deve ser publicada em 2015). Nela existe um tópico de classificação de transtornos relacionados ao estresse, o F43, intitulado “Reação a estresse severo e transtornos de ajustamento”. Este tópico está dividido nos subtópicos: reação aguda ao estresse, transtorno de estresse pós-traumático, reações de ajustamento (este subdividido em sete subcategorias), outras reações ao estresse severo e reações inespecíficas ao estresse severo.

Já o manual da Associação Americana de Psiquiatria DSM-IV (do inglês *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*), classifica os transtornos relacionados ao estresse como uma subcategoria dos transtornos ansiosos e os de ajustamento como uma categoria independente. A quinta versão deste manual, que estava disponível *on-line* para consultas e sugestões até o final de 2012 e será publicada em

maio de 2013, propõe mudanças em praticamente todos os tópicos relacionados à classificação do transtorno de estresse pós-traumático em relação a sua versão anterior, sendo a principal a criação de uma categoria específica para este transtorno.

A ocorrência destes transtornos é influenciada por diversos fatores relacionados ao indivíduo como o gênero, a idade, a experiência prévia e fatores genéticos (JOËLS; BARAM, 2009).

1.2. PREVALÊNCIA

Mulheres são duas vezes mais propensas a sofrer de transtornos relacionados ao estresse (DITLEVSEN; ELKLIT, 2012). E os dados de prevalência dos transtornos em seres humanos sugerem que esta diferença está associada a diferenças biológicas (BANGASSER; VALENTINO, 2012).

Estudos recentes de prevalência realizados nos Estados Unidos e na grande São Paulo (Brasil) determinam uma maior prevalência de transtornos ansiosos e depressivos unipolares em mulheres. O estudo brasileiro aponta também uma maior prevalência de dependência ao álcool e outras substâncias de abuso em homens, como mostrado nas tabelas 1 e 2, respectivamente.

Tabela 1: Prevalência de transtornos ansiosos e depressivos ao longo da vida nos EUA. Dados em negrito representam diferenças significativas entre os gêneros (retirado de KESSLER et al., 2012).

Transtorno	Mulheres	Homens	Total
Pânico	4,8%	2,7%	3,8%
Ansiedade generalizada	5,5%	3,1%	4,3%
Agorafobia	3,2%	1,8%	2,5%
Fobia social	12,3%	8,9%	10,7%
Fobia específicas	18,7%	12,3%	15,6%
Ansiedade de separação	8,3%	5,2%	6,7%
TEPT	8,5%	2,8%	5,7%
TOC	3,0%	1,6%	2,3%
Episódio depressivo	20,7%	12,3%	16,6%
Transtorno depressivo maior	18,1%	10,7%	14,4%
Bipolar	2,7%	2,2%	2,5%

Tabela 2: Prevalência de transtornos ansiosos, depressivos e dependência ao longo da vida no Brasil (grande São Paulo).

Transtorno	Mulheres	Homens	Total
Pânico	2,5%	0,9%	1,7%
Ansiedade generalizada	4,6%	2,6%	3,7%
Agorafobia	3,6%	1,3%	2,5%
Fobia social	6,7%	4,2%	5,6%
Fobia específicas	16,5%	7,9%	12,4%
Ansiedade de separação	8,6%	6,7%	7,7%
TEPT	4,6%	1,6%	3,2%
TOC	7,6%	5,8%	6,7%
Distímia	2,2%	0,9%	1,6%
Depressão maior	23,0%	10,0%	16,9%
Bipolar	2,1%	2,2%	2,1%
Dependência ao álcool	1,0%	5,8%	3,3%
Dependência a outras drogas	0,8%	2,0%	1,4%

Dados em negrito representam diferenças significativas entre os gêneros (retirado de VIANA; ANDRADE, 2012).

Os encéfalos de homens e mulheres poderiam ser comparados a dois mosaicos com diversas semelhanças e diferenças, e a maneira como uma mesma informação é processada por cada um desses mosaicos pode ser idêntica ou completamente diferente dependendo de uma série de fatores (CAHILL, 2006).

A diferença entre gêneros na resposta ao estresse só aparece após a puberdade, indicando um potencial efeito 'protetor' da testosterona na responsividade ao estresse (BECKER et al., 2007). Já a variação cíclica dos níveis plasmáticos de estradiol e progesterona aumenta a responsividade do eixo HPA ao estresse e torna as mulheres mais susceptíveis aos transtornos a ele relacionados, como a ansiedade e a depressão (SEEMAN, 1997).

O tipo de estressor em associação com as respostas psicológicas e fisiológicas por ele produzidas irão determinar as consequências do estresse sobre a saúde do indivíduo. Assim, as alterações na responsividade do eixo HPA de mulheres parece estar relacionada com a maior prevalência de transtornos ansiosos, depressivos e de TEPT encontrados (OLFF et al., 2007).

Por outro lado, fatores genéticos são determinantes importantes no risco ou resiliência a transtornos psiquiátricos (RUSSO et al., 2012). Kloet, Joëls e Holsboer (2005) consideram como fatores que determinarão a resiliência ou susceptibilidade de um indivíduo aos efeitos de um estressor severo a pré-disposição genética e a epigenética.

Cerca de 50% da população estadunidense sofre traumas severos, porém apenas 7,8% destes indivíduos desenvolvem algum transtorno (KESSLER et al. 1995), o que indica que a maioria da população é resistente (resiliente) a situações de estresse.

Russo e colaboradores (2012) definem a resiliência como a capacidade da maioria das pessoas, quando expostas a uma situação extrema de estresse, em manter um funcionamento fisiológico e psicológico normal, evitando o desenvolvimento de transtornos psiquiátricos. Estes pesquisadores defendem também que a resiliência não é caracterizada apenas pela ausência de patologias, mas por um processo adaptativo ativo em resposta ao estressor. Assim, enquanto indivíduos susceptíveis não se adaptam e apresentam respostas inapropriadas ao estresse, que se transformam em um estado persistente de estresse, indivíduos resilientes percebem a adversidade

como pouco ameaçadora e desenvolvem respostas fisiológicas e psicológicas adaptativas (DEL GIUDICE et al., 2011).

O eixo HPA é essencial para a sobrevivência dos indivíduos, pois coordena as respostas endócrinas, neurais e imunológicas a diversos estímulos estressores que ameaçam a homeostase do organismo. A falha na regulação de respostas ao estresse agudo, assim como a persistência do estressor, pode levar a alterações neurobiológicas que podem resultar em transtornos relacionados ao estresse (OLFF; LANGELAND; GERSON, 2005). A prevalência destes transtornos é maior em mulheres que em homens (BRESLAU, 2002; KESSLER, 2003). Sendo assim, é fundamental entender os mecanismos subjacentes a essas diferenças através dos estudos de modelos animais de resposta a um estressor.

1.3. MODELOS ANIMAIS

O estresse é um fator de risco para o desenvolvimento de transtornos ansiosos e depressivos, e até mesmo sua causa. Portanto, o estudo das alterações comportamentais induzidas por um estressor utiliza como ferramenta os modelos para estudo da ansiedade e da depressão.

Os modelos de ansiedade se dividem em modelos de condicionamento e modelos etológicos. Os modelos etológicos se baseiam nas reações de defesa dos animais expostos a situações aversivas, e neste trabalho utilizaremos o labirinto em cruz elevado que é o mais empregado entre os modelos etológicos (GRAEFF, 2005). Outro teste utilizado neste trabalho foi o sobressalto acústico, e este teste não se encaixa claramente em nenhuma das categorias relatadas. A resposta de sobressalto pode ser provocada por um estímulo sensorial súbito e intenso e consiste de uma contração muscular forte de todo o corpo (SZABO, 1965). Esta resposta começa na cabeça e se propaga por todo o corpo produzindo flexões transitórias que são medidas como alterações na força exercida no chão pelas patas (BLASZCZYK; TAJCHERT, 1996). Diversos estudos propõem o teste do sobressalto acústico como uma ferramenta no estudo das emoções, pois esta resposta reflexa está aumentada em situações aversivas

(WALKER; DAVIS, 1997; PLAPPERT; PILZ, 2002) e atenuada na presença de uma situação hedônica (SCHMID; KOCH; SCHNITZLER, 1995).

Em relação à depressão, os principais modelos utilizados atualmente envolvem a apresentação de um estressor. Entre eles temos o desamparo aprendido, que envolve o condicionamento dos animais, o desespero comportamental (*behavioral despair*) e a indução de estados anedônicos, como a preferência por uma solução doce como medida de anedonia induzida por estresse. Outros modelos envolvem dano cerebral e separação (materna ou isolamento) (GUIMARÃES, 2005).

1.3.1. Linhagens

Os camundongos se estabeleceram como um modelo animal no início de 1900. Endocruzamentos posteriores realizados por pesquisadores levaram à criação de várias linhagens de camundongos de laboratório, incluindo C57BL/6, BALB/c, e DBA, com características bem definidas que as distinguem entre si. As linhagens podem ser divididas em heterogênicas e isogênicas. Linhagens heterogênicas apresentam uma grande variabilidade genética e são linhagens de escolha quando o estudo visa traçar um paralelo com a variabilidade encontrada em populações humanas. Populações heterogênicas não são simplesmente grandes populações derivadas de acasalamentos aleatórios, mas apresentam variações genéticas consideráveis de tempos em tempos em uma mesma colônia e entre diferentes colônias (CUI; CHESSON; HOPE, 1993).

Em 1926, Clara J. Lynch, uma pesquisadora da genética do câncer, do Instituto de Pesquisa Médica Rockefeller, em Nova York, importou dois machos e sete fêmeas de camundongos albinos *stocks*, não isogênicos, de André de Coulon. Como André trabalhava no Centro Anticâncer em Lausanne, na Suíça, todos os camundongos derivados deste local ficaram conhecidos como *Swiss* (suíço) devido ao apelido utilizado por Lynch e o pessoal de seu laboratório. Esses animais eram derivados de uma colônia não isogênica (população formada por indivíduos geneticamente diferentes e heterozigóticos) do Instituto Pasteur em Paris, comprados antes de 1920, sendo então animais geneticamente heterogêneos que deram origem a muitas outras linhagens como a *Swiss-Webster* (ou CF1) e o CD1 (ou ICR) (LYNCH, 1969; RICE; O'BRIEN, 1980).

O desenvolvimento de linhagens isogênicas teve origem em 1900 quando uma professora americana aposentada passou a criar camundongos 'extravagantes' em sua fazenda. Estes camundongos foram objeto de estudo de William Castle, um dos pioneiros da genética de camundongos moderna, na Universidade de Harvard. E, em 1909, o fundador dos laboratórios Jackson (JAX), atualmente o principal fornecedor de camundongos dos Estados Unidos, Clarence Cook Little criou a primeira linhagem de camundongos isogênica, a DBA e alguns anos depois a C57BL/6, que se tornou a linhagem isogênica mais utilizada no mundo. O uso de camundongos no estudo do comportamento ganhou notoriedade no início dos anos 90 com o surgimento dos transgênicos (CRYAN; HOLMES, 2005). A grande vantagem do uso de linhagens isogênicas é a uniformidade genética ao longo do tempo e a eliminação de uma variável (variabilidade genética) na interpretação dos resultados obtidos com essas linhagens desde que as matrizes sejam geneticamente monitoradas e mantidas cuidadosamente (CUI; CHESSON; HOPE, 1993).

Os parâmetros comportamentais diferem enormemente entre as diferentes linhagens isogênicas e tal aspecto tem sido utilizado como ferramenta para se investigar os fatores genéticos subjacentes a estes comportamentos (TARANTINO et al., 2000). Entretanto, poucos trabalhos comparam parâmetros comportamentais e fisiológicos entre linhagens heterogênicas e isogênicas.

1.3.2. Diferenças comportamentais relacionadas ao ciclo estral

O cérebro de fêmeas funciona em um meio de mudanças químicas cíclicas em função do ciclo estral. Muitos dos hormônios sexuais são neuroativos e atuam em receptores de membrana e nucleares. As flutuações hormonais ao longo do ciclo parecem alterar a responsividade ao estresse já que ratos e camundongos fêmeas no diestro apresentam um comportamento ansiogênico e maior responsividade aos estressores do que aquelas no proestro e estro (LOVICK, 2012).

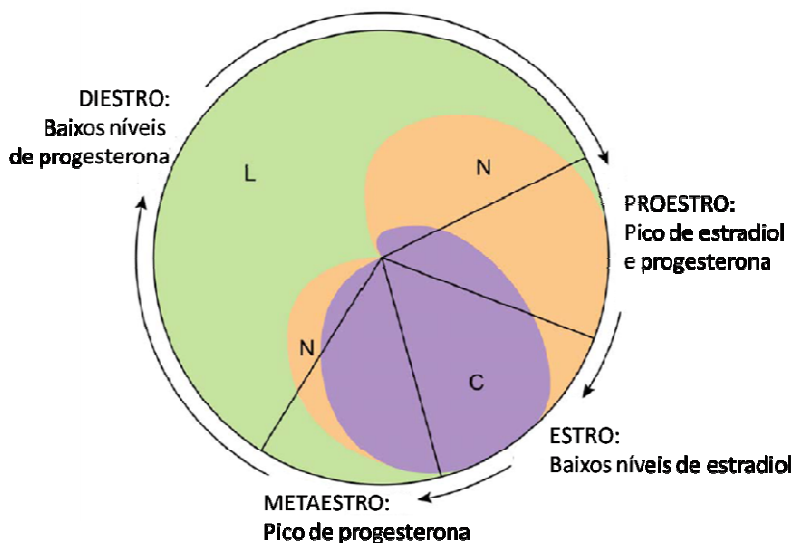


Figura 5: Variação citológica e hormonal ao longo do ciclo estral. L: leucócitos, N: células epiteliais nucleadas, C: células epiteliais cornificadas (adaptado de BYERS et al., 2012).

1.4. HIPÓTESE

Considerando a influência genética sobre a resposta fisiológica e comportamental ao estresse, nossa hipótese é de que camundongos de linhagens heterogênicas respondem ao estresse de maneira diferente de animais de linhagens isogênicas.

1.5. JUSTIFICATIVA

O estresse vem sendo apontado como gatilho e causa de muitas doenças, principalmente os transtornos psiquiátricos. Porém, estes são eventos complexos e multifatoriais, sendo apontados como alguns destes fatores o sexo, a hereditariedade e o ambiente. Portanto, são necessários estudos que investiguem a influência destes fatores nas respostas emocionais ao estresse para assim avançarmos no entendimento das psicopatologias relacionadas ao estresse.

2. OBJETIVOS

Comparar as respostas comportamentais basais em testes de ansiedade e depressão de duas linhagens de camundongos fêmeas, *Swiss* e C57BL/6J, além de comparar suas respostas a um estressor físico.

2.1. OBJETIVO GERAL

Comparar as respostas comportamentais de camundongos fêmeas das linhagens *Swiss* e C57BL/6J, nos testes de sobressalto acústico, labirinto em cruz elevado e consumo de sacarose.

2.1.2. Objetivos Específicos

- Padronizar o teste de sobressalto acústico nas linhagens *Swiss* e C57BL/6J;
- Comparar o comportamento basal das linhagens *Swiss* e C57BL/6J nos seguintes testes: labirinto em cruz elevado, sobressalto acústico e consumo de sacarose;
- Avaliar o efeito do estresse agudo uma, seis e 24 h antes do teste de sobressalto acústico;
- Avaliar os efeitos do estresse repetido por 3, 10 e 21 dias no labirinto em cruz elevado e no sobressalto acústico;
- Avaliar o efeito do estresse repetido por 10 e 21 dias sobre o consumo de sacarose.

3. METODOLOGIA

3.1. ANIMAIS

Utilizamos camundongos de duas linhagens, conforme descrito abaixo, de três a quatro meses de idade. Os animais foram mantidos em estantes ventiladas (Alesco®, Monte Mor, São Paulo) sendo discriminados por sexo, sob ciclo de 12h (luzes acesas às 7h) e temperatura constante ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$). Os animais tiveram livre acesso à água e alimento exceto durante o período dos experimentos, que foram realizados sempre no período da tarde, entre 13 e 18h.

- 1) Camundongos *Swiss* fêmeas, provenientes do Biotério Central (BC) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Após o desmame os animais foram transferidos do BC ao Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia onde permaneceram até completar 80 dias quando foram transferidos para o biotério do Laboratório de Neurofarmacologia. Os animais foram mantidos em alojamento padrão com no máximo 16 animais por caixa plástica (41 x 34 x 16 cm).
- 2) Camundongos C57BL/6L (B6) fêmeas, provenientes de nossa colônia oriundos originalmente da Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI). Após o desmame foi feita a sexagem dos animais que foram alojados em caixas moradia padrão (27 x 16 x 13 cm) de acordo com a ninhada de origem e data de nascimento, sendo no máximo sete animais por caixa até o momento dos experimentos.

A diferença de acomodação entre as linhagens está de acordo com os cálculos propostos no guia de cuidados animais do Conselho Nacional de Pesquisa dos EUA (*Guide for the care and use of laboratory animals*) que estabelece uma área de 96,7 cm², ou maior, por animal com 25 g ou mais (*Swiss*) e uma área entre 51,6 e 77,4 cm² para animais pesando entre 15 e 25 g (C57BL/6J).

3.1.1. Considerações éticas

Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com os padrões internacionais de bem-estar dos animais recomendados pela Sociedade Brasileira de Neurociência e Comportamento (SBNeC) e pela *Society for Neuroscience* (SFN) e obedecendo a lei nacional nº 11.794 (2008). Foram utilizadas amostras de tamanho mínimo e adequado para as análises estatísticas e extraíndo-se o máximo de informações relevantes em cada protocolo experimental, todos esses aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animal (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (protocolo de pesquisa nº 798).

3.2. TESTES COMPORTAMENTAIS

3.2.1. Sobressalto acústico

O aparato (Insight®) consiste de uma caixa de isolamento acústico - 76,0 x 48,5 x 70,5 cm (AxLxP) - produzida em madeira, forrada em fórmica e placas de isolamento acústico no interior, com ventilador para exaustão e circulação de ar interno e porta frontal com janela de vidro. Esta caixa é acoplada a um sistema de interface digital com gerador de som, luz e corrente. No interior da caixa há um autofalante e uma base para gaiola de contenção com estabilímetro de 2 kg para detecção do reflexo de sobressalto.

O sobressalto acústico é proposto como uma ferramenta no estudo da emocionalidade, já que esta resposta pode ser modulada pelo estado emocional do animal (Walker & Davis, 1997; Plappert & Pilz, 2002; Schmid, Koch & Schnitzler, 1995).

3.2.1.1. Procedimento experimental

a. Padronização

No teste, cada animal foi colocado no interior do aparelho e após cinco minutos de habituação, exposto a 10 estímulos sonoros de intensidade variada: 70, 75, 80, 85, 90, 100, 110 e 120 dB (total de 80 estímulos), apresentados de forma randomizada ao longo da sessão. As intensidades foram escolhidas com base na literatura (WILLOT et al., 2003; VALSAMES; SCHIMID, 2011). Durante a habituação e a resposta de sobressalto o ruído de fundo foi mantido a 65 dB. O intervalo entre

a apresentação dos estímulos sonoros variou aleatoriamente de 10 a 20 segundos, totalizando uma sessão de aproximadamente 30 minutos.

Uma semana após a exposição ao teste de sobressalto acústico, oito machos e 16 fêmeas de cada linhagem foram expostos ao labirinto em cruz elevado (LCE).

b. Teste

O protocolo experimental consistiu de três ou quatro dias, sendo os dois primeiros para habituação e o(s) último(s) de teste. Os animais foram submetidos a uma sessão de aproximadamente nove minutos que consistiu em cinco minutos de habituação seguidos da apresentação de 16 estímulos de 120 dB (C57BL/6J) ou 100 dB (*Swiss*). Essas intensidades foram escolhidas a partir de um estudo prévio do laboratório onde foram utilizados machos e fêmeas, nesta padronização encontrou-se que o machos da linhagem *Swiss* respondem a estímulos entre 75 e 100 dB enquanto machos e fêmeas da linhagem C57BL/6J respondem a estímulos que variam de 70 a 120 dB, sendo a resposta ao estímulo de 120 dB a mais homogênea. Durante a habituação e a resposta de sobressalto o ruído de fundo foi mantido a 65 dB. O intervalo entre os estímulos sonoros variou aleatoriamente de 10 a 20 segundos.

3.2.2. Labirinto em cruz elevado

O aparelho consiste de dois braços abertos (30 x 5 cm) unidos ortogonalmente a dois braços fechados (30 x 5 x 15 cm), elevados 45 cm do solo (Insight®). As paredes dos braços fechados são de acrílico transparente e o assoalho de acrílico opaco cinza. Nos braços abertos há uma borda de 0,5 cm para impedir a queda dos animais.

As sessões experimentais foram monitoradas por uma câmera de vigilância, posicionada sobre o aparato, diretamente ligada a um computador localizado na antessala. O programa GeoVision® gravava as imagens capturadas para posterior análise. A única fonte de iluminação na sala foi uma lâmpada vermelha de 20 W, resultando em uma luminosidade de três lux em todo o aparelho.

Os animais foram colocados no centro do labirinto com a cabeça voltada para um dos braços abertos. Durante cinco minutos os seguintes comportamentos foram registrados: entradas nos braços

abertos (número de vezes em que o animal cruzava com as quatro patas linha divisória de cada braço), tempo de permanência nos braços abertos, exploração das extremidades dos braços abertos (entradas e permanência) - utilizados como índices de ansiedade. O parâmetro utilizado como indicador de atividade locomotora foi a frequência de entradas nos braços fechados. Medidas de avaliação etológica também foram registradas, sendo elas o número de levantamentos ou '*rearings*' (quando o animal se apoia nas patas posteriores, com o tronco perpendicular ao piso, tendo a cabeça dirigida para cima e tocando, ou não, com as patas anteriores, as paredes), os comportamentos de avaliação de risco (quando o animal estica o corpo, direcionando a cabeça ao braço aberto, podendo colocar uma, duas ou até três patas no braço aberto e retornando à posição original), mergulhos de cabeça ou '*head dipping*' (quando o animal direciona a cabeça em direção ao solo) e a comportamentos de auto limpeza ou '*grooming*'.

Em animais tratados com fármacos ansiolíticos utilizados na clínica observa-se um aumento significativo no número de entradas e na permanência nos braços abertos, já o número de entradas nos braços fechados não é alterado. Este resultado é interpretado como um efeito ansiolítico seletivo, ou seja, desacompanhado de efeito sedativo. Já em animais tratados com substâncias ansiogênicas para seres humanos observa-se uma diminuição na exploração relativa dos braços abertos e, frequentemente, diminuem também o número de entradas nos braços fechados, possivelmente porque a ansiedade resulta em inibição comportamental generalizada (GUIMARÃES, 2005).

3.2.3. Consumo de sacarose

Este teste tem sido extensivamente utilizado para avaliar os efeitos da anedonia induzida por estresse (WILLNER, 2005), e consiste de um protocolo de livre escolha entre duas soluções, água e sacarose 0,8%. Após a última sessão de estresse os animais foram isolados e habituados a beber água de duas garrafas por 24h. No segundo dia uma das garrafas de água foi substituída por uma solução de sacarose 0,8% (medida basal). Após 24h foi feita a primeira medida e a posição das garrafas foi invertida para evitar o viés da preferência do animal por um lado específico e 24h após esta medida foi realizada a última aferência. O consumo das duas soluções foi medido através da diferença de peso das garrafas 24 e 48 horas após a apresentação da

solução de sacarose (TADAIESKY et al., 2008; SLATTERY; MARKOU; CRYAN, 2007).

O consumo de líquidos nos dois dias foi somado e a preferência pela sacarose sobre a água foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\left[\frac{\text{consumo de sacarose}}{\text{consumo total de líquido (sacarose+água)}} \right] * 100$$



Figura 6: Esquema representativo do teste de preferência por sacarose (SILVA, 2012).

3.3. ESTRESSE POR CONTENÇÃO NO FRIO

Os animais foram individualmente colocados em um tubo de PVC com três cm de diâmetro e 10 cm de comprimento, ficando com seus movimentos restritos sendo imediatamente colocados na geladeira a uma temperatura de 4°C por 30 minutos (DE LIMA, 1991).

3.3.1. Protocolos

3.3.1.1. Estresse agudo:

Os animais foram submetidos ao protocolo de sobressalto acústico para investigar os efeitos do estresse agudo sobre esta resposta. Para isso os animais passaram por dois dias de habituação ao protocolo experimental, no terceiro dia foi realizada a sessão pré-estresse que representa os valores basais de cada animal neste paradigma. Então uma, seis ou 24 horas antes da sessão pós-estresse os animais foram submetidos a uma única sessão de protocolo de contenção no frio (30 min), como mostrado na Figura 7. Os resultados foram expressos em valores absolutos de sobressalto.

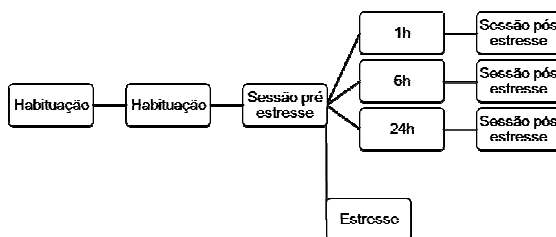


Figura 7: Esquema dos experimentos de estresse agudo.

A definição de tratamentos subcrônicos e crônicos pela toxicologia leva em consideração o tempo médio de vida do animal, logo tratamentos que duram de 30 a 90 dias são considerados subcrônicos e tratamentos que duram de três meses a um ano são considerados crônicos para roedores (BRITO, 1994). Por isso, mesmo que na resposta ao estresse a persistência do estressor, assim como de suas respostas mal-adaptativas, por sete dias já seja considerada uma situação crônica (JOËLS; BARAM, 2009), optamos por utilizar a terminologia estresse repetido em cada uma das diferentes durações.

3.3.1.2. *Estresse repetido três dias (3 D)*

Os animais foram inicialmente submetidos aos dois dias de habituação ao sobressalto acústico (SA) e a sessão pré-estresse. Ao final desta sessão os animais foram submetidos a três sessões de estresse de contenção (30 min) a intervalos de 24h. A sessão pós-estresse foi realizada 24h após a última contenção, e no dia seguinte os animais foram avaliados no labirinto em cruz elevado (LCE) (Fig. 8).

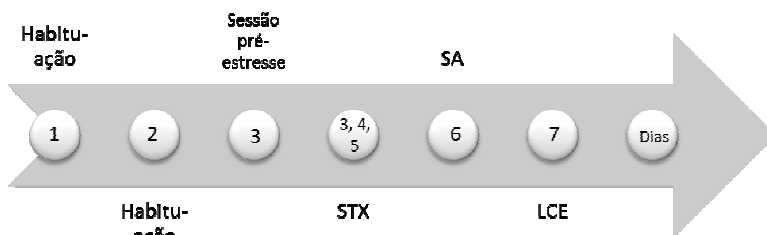


Figura 8: Esquema do protocolo experimental do estresse repetido por três dias.

3.3.1.3. Estresse repetido 10 dias (10 D)

Os animais foram submetidos a 10 dias de contenção no frio, por 30 minutos cada dia, sempre no mesmo período. Após a última sessão de estresse os animais foram isolados para o protocolo de consumo de sacarose, conforme descrito anteriormente. Após o final deste protocolo os animais foram realocados em suas caixas originais por dois dias, e no quinto dia após o término do estresse os animais foram submetidos ao labirinto em cruz elevado e 48 h após, aos três dias subsequentes à habituação e teste do sobressalto acústico (Fig. 9).

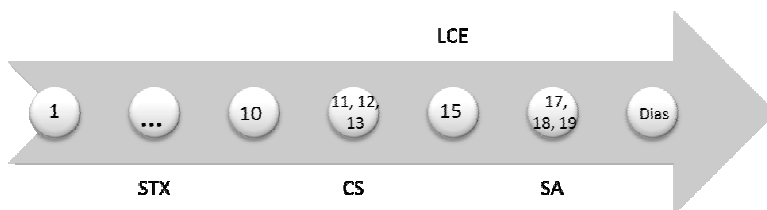


Figura 9: Esquema dos experimentos de estresse repetido 10 dias.

3.3.1.4. Estresse repetido por 21 dias (21 D)

Os animais foram submetidos a 21 dias de contenção no frio por 30 minutos sempre no mesmo período. E então submetidos à sequência de testes idêntica ao protocolo 10 D (Fig 10).

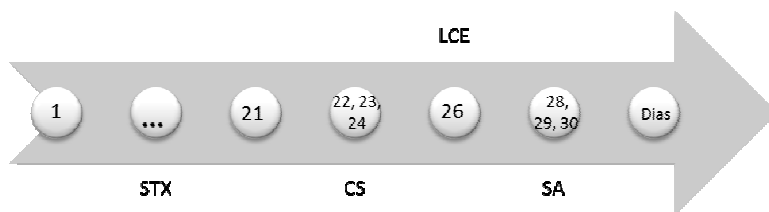


Figura 10: Esquema dos procedimentos no estresse repetido por 21 dias.

Em todos os protocolos um grupo de animais da mesma idade foi mantido em condições de alojamento padrão, sendo manipulados apenas no momento da troca das caixas, até a realização dos testes comportamentais quando foram utilizados como grupo controle (*naïve*).

3.4. VERIFICAÇÃO DO CICLO ESTRAL

Após a realização dos testes experimentais, para evitar o viés desta manipulação estressante sobre o comportamento dos animais, o ciclo estral das fêmeas foi aferido por análise citológica *a fresco* do lavado vaginal. A diferenciação citológica foi feita com base no trabalho de Byers e colaboradores (2012), onde:

- ✓ estro é caracterizado pelo predominância de células epiteliais cornificadas e ausência de leucócitos;
- ✓ metaestro é caracterizado por uma mistura de células epiteliais cornificadas e leucócitos;
- ✓ diestro é caracterizado pelo predomínio de leucócitos e poucas células epiteliais;
- ✓ proestro é caracterizado pelo predomínio de células epiteliais nucleadas e algumas células epiteliais cornificadas.

Devido à análise posterior ao teste o número de animais em cada grupo sofreu grande variação.

3.5. ANÁLISE DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE CORTICOSTERONA

3.5.1. Obtenção das amostras para o ensaio

Os animais submetidos aos protocolos de estresse (repetido, subcrônico e crônico) foram decapitados dois dias após o último teste

comportamental. Já os animais dos protocolos de estresse agudo (um, seis e 24 horas antes da decapitação) não passaram por testes comportamentais assim como os *naïves*. O sangue foi coletado em microtubos plásticos de 1,5 mL contendo 40 µL de uma solução de heparina 10% e mantidos em gelo até o momento em que foram centrifugados por 10 minutos a uma velocidade de 7000 r.p.m. Após a centrifugação o plasma foi separado e armazenado em freezer -80 °C até o momento da análise. Todos os animais foram sacrificados entre 11 e 15h. O número total de amostras analisadas foi de quatro por grupo sendo as medidas realizadas em duplicata.

3.5.2. Dosagem

A quantificação dos níveis de corticosterona plasmática foi realizada por imunoensaio enzimático (ELISA), baseado no princípio de *binding* competitivo adquirido da IBL® *International GMBH*, Hamburg, Alemanha. As amostras foram diluídas em uma proporção 1:100 em padrão zero fornecido pelo distribuidor do *kit* e os procedimentos realizados de acordo com a descrição do *kit*. A leitura de absorbância foi realizada em um leitor de placas *Infinite M200* TECAN®.

3.5.3. Conversão de dados

Os dados de absorbância foram transformados em concentração (nmol/L) por regressão não-linear a partir de uma curva padrão no programa GraphPad Prism versão 5.0®. Essa concentração foi multiplicada por 100 para corrigir a diluição realizada e então multiplicada por 0,34646 (valor fornecido pelo *kit*) para converter essa concentração a ng/mL.

3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados da padronização do sobressalto acústico foram analisados por análises de variância (ANOVA) de uma via com medidas repetidas, utilizando a intensidade de estímulo como fator de repetição, seguida do teste *post hoc* de Newman-Keuls.

As comparações entre linhagens, nos testes de sobressalto acústico, labirinto em cruz elevado e preferência por sacarose, assim como os efeitos dos diferentes protocolos de estresse, foram

analizadas por testes t de *Student* não pareados. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Em todos os experimentos realizados foram utilizados grupos independentes de animais.

4. RESULTADOS

4.1. SOBRESSALTO ACÚSTICO

Na figura 11 a ANOVA de uma via utilizando as diferentes intensidades de estímulo como fator de repetição revelou uma diferença significativa entre as linhagens [$F(1, 58) = 11,249$; $p = 0,001$] e entre as diferentes intensidades de estímulo [$F(7, 406) = 5,988$; $p = 0,000001$], mas não da interação entre os dois fatores [$F(7, 406) = 0,572$; $p = 0,779$].

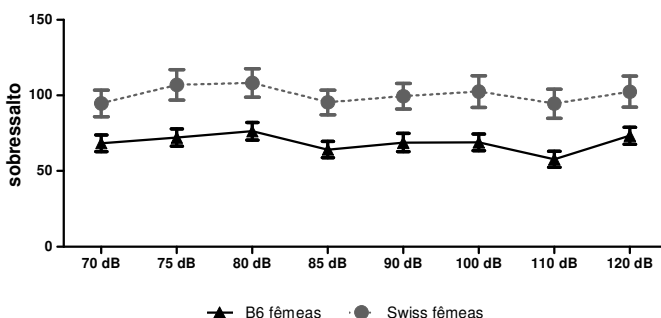


Figura 11: Análise da resposta de sobressalto acústico em camundongos fêmeas utilizando a linhagem como variável independente (Swiss vs C57BL/6J (B6)) e as diferentes intensidades de estímulo como fator de repetição. Resultados expressos como média ± e.p.m. ANOVA de uma via com medidas repetidas.

No painel superior da figura 12 o teste *post hoc* de Newman-Keuls mostra que apenas a intensidade de 110 dB difere de todas as outras na ANOVA de medidas repetidas para a fase do ciclo estral [$F(2, 32) = 0,399$; $p = 0,674$] com a intensidade de estímulo como fator de repetição [$F(7, 224) = 5,638$; $p = 0,00001$] e também não há interação os dois fatores [$F(14, 224) = 0,573$; $p = 0,884$], para as fêmeas C57BL/6J (B6). No painel inferior da mesma figura a ANOVA de medidas repetidas para a fase do ciclo estral [$F(2, 18) = 2,185$; $p = 0,141$] não há efeito da intensidade de estímulo [$F(7, 126) = 1,050$; $p = 0,340$] e nem

da interação entre os fatores [$F(14, 126) = 0,640$; $p = 0,827$], em fêmeas *Swiss*.

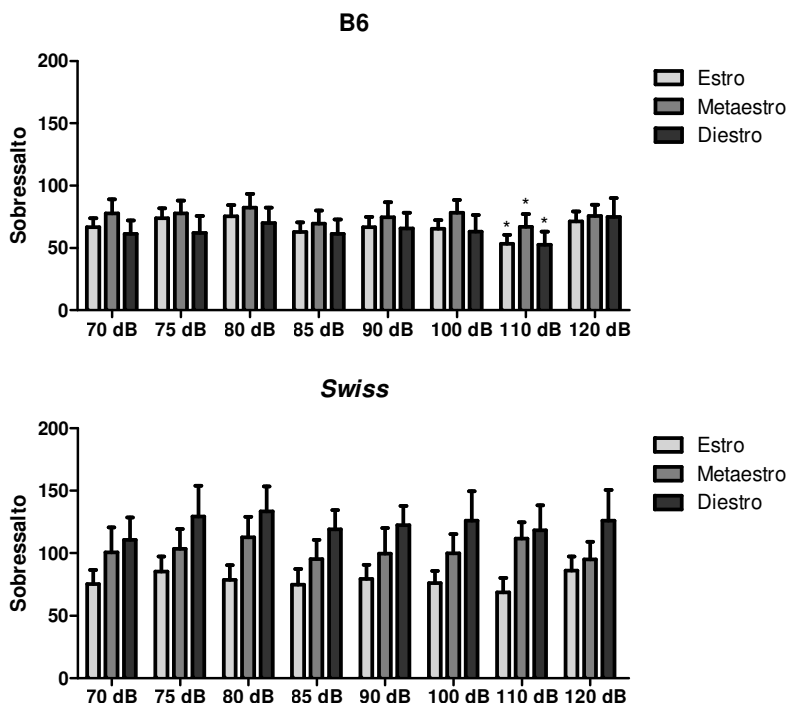


Figura 12: Respostas de sobressalto de camundongos C57BL/6J e *Swiss* fêmeas analisadas de acordo com a fase do ciclo estral. Resultados expressos como média + e.p.m. ANOVA de medidas repetidas seguida do teste de *post hoc* de Newman Keuls.* valores de $p < 0,05$.

Os resultados obtidos na sessão pré-estresse do sobressalto acústico, de todos os protocolos realizados, foram analisados de acordo com a fase do ciclo estral para cada linhagem já que neste momento houveram animais suficientes para análise estatística em todas as quatro fases do ciclo. A ANOVA de uma via não revelou diferenças significativas entre as respostas de sobressalto das fêmeas C57BL/6J [F

(3,92) = 1,402; $p = 0,25$] ou *Swiss* [$F(3,76) = 0,5946$; $p = 0,62$] nas diferentes fases do ciclo estral.

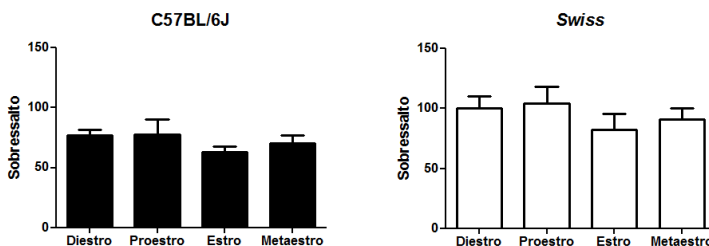


Figura 13: Efeito do ciclo estral sobre a resposta de sobressalto em fêmeas da linhagem C57BL/6J e *Swiss* a uma intensidade de estímulo, 100 dB (*Swiss*) e 120 dB (C57BL/6J). Resultados expressos como média + e.p.m. ANOVA de uma via.

Observamos na figura 14 que apenas o estresse repetido por 21 dias [$T(28) = 2,652$; $p = 0,01$] foi capaz de provocar alterações significativas na resposta de sobressalto de camundongos C57BL/6J [1h: $T(40) = 0,943$; $p = 0,35$; 6h: $T(16) = 1,236$; $p = 0,23$; 24h: $T(14) = 0,243$; $p = 0,81$; 3 D:T(15) = -0,519; $p = 0,61$; 10 D: $T(11) = -1,624$; $p = 0,13$].

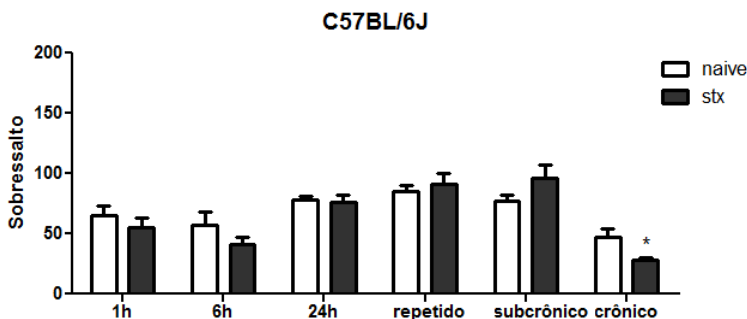


Figura 14: Efeito dos diferentes protocolos de estresse sobre a resposta de sobressalto de camundongos C57BL/6J fêmeas. Resultados expressos como média + e.p.m. Teste T de *Student* não pareado. * valores de $p < 0,05$.

A figura 15 ilustra a resposta de sobressalto de fêmeas C57BL/6J uma hora após o estresse agudo em todas as fases do ciclo estral. Os resultados do proestro não foram incluídos na ANOVA devido ao número insuficiente de animais (2 *naïve* e 1 *stx*). A ANOVA de duas vias não revelou efeito do ciclo [$F(2, 33) = 1,083$; $p = 0,35$], do estresse [$F(1, 33) = 0,344$; $p = 0,56$] nem da interação entre os dois fatores [$F(2, 33) = 2,729$; $p = 0,08$].

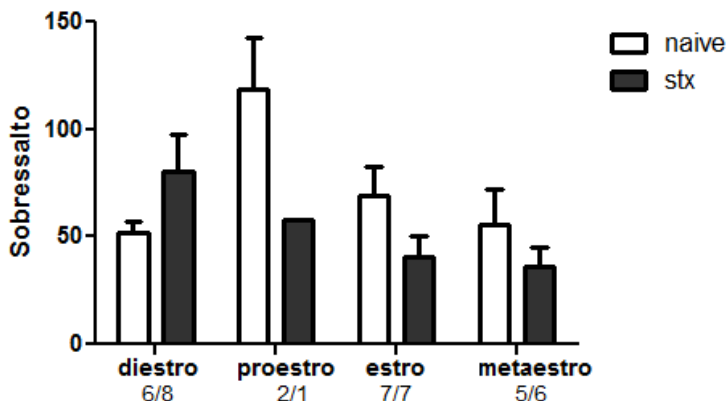


Figura 15: Efeito do estresse agudo (1h antes) sobre a resposta de sobressalto de camundongos C57BL/6J fêmeas de acordo com a fase do ciclo estral. Resultados expressos em média + e.p.m. ANOVA de duas vias seguida do *post hoc* Newman-Keuls.

Na figura 16 observamos que o padrão de respostas das fêmeas *Swiss* é diferente. Observamos uma redução da resposta de sobressalto apenas na avaliação 1h após o estresse agudo [$T(14) = 2,984$; $p = 0,01$] e nenhuma alteração nos outros protocolos [6h: $T(14) = 0,913$; $p = 0,38$; 24h: $T(14) = 0,668$; $p = 0,52$; 3 D: $T(14) = 0,483$; $p = 0,64$; 10 D: $T(14) = 0,024$; $p = 0,98$; 21 D: $T(19) = -0,445$; $p = 0,66$].

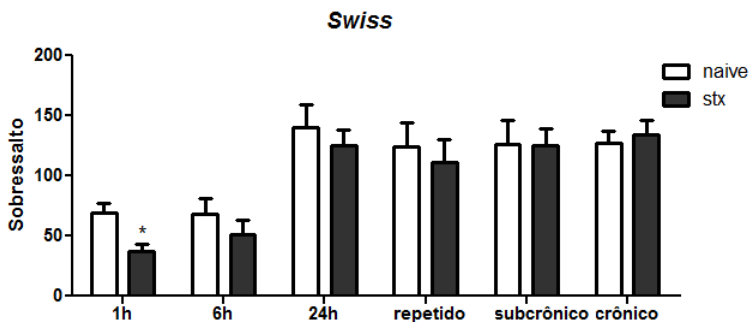


Figura 16: Efeito dos diferentes protocolos de estresse sobre a resposta de sobressalto de camundongos *Swiss* fêmeas. Resultados expressos em média + e.p.m. Teste T de *Student* não pareado. * valores de $p < 0,05$.

4.2. LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

A figura 17 ilustra as medidas espaço-temporais de camundongos fêmeas das linhagens C57BL/6J e *Swiss* no LCE. O teste t de *Student* não pareado revelou diferenças significativas nos seguintes parâmetros: entradas nos braços abertos (EBA) [$T(30) = -3,072$; $p = 0,004$], permanência nos braços abertos (TBA) [$T(30) = -3,453$; $p = 0,002$] e permanência na extremidade do braço aberto (ExBA) [$T(30) = -8,383$; $p = 0,0000001$].

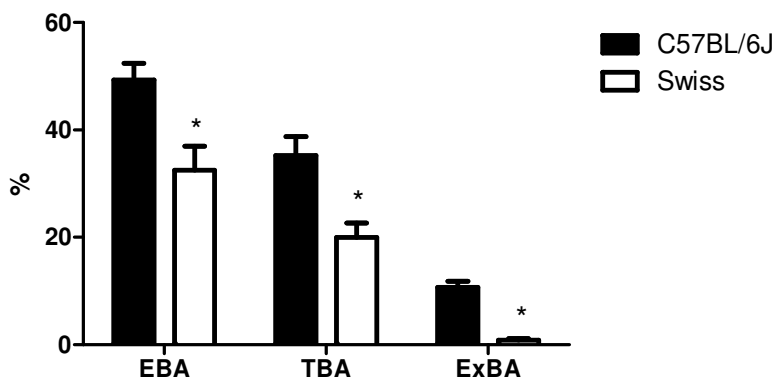


Figura 17: Diferença entre camundongos fêmeas das linhagens C57BL/6J e *Swiss* nas medidas espaço-temporais do labirinto em elevado. EBA, entradas nos braços abertos; TBA, permanência nos braços abertos; ExBA permanência na extremidade do braço aberto. Resultados expressos como média + e.p.m. Teste t de *Student* não pareado. * valores de $p < 0,05$.

Não há diferença entre as linhagens no parâmetro relacionado à locomoção, ou seja, nas entradas nos braços fechados [$T(30) = -0,248$; $p = 0,805$], das fêmeas das linhagens C57BL/6J e *Swiss*, como mostra a figura 18.

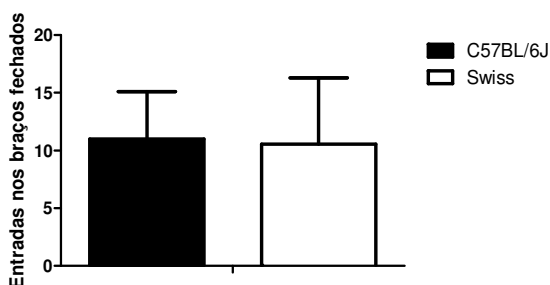


Figura 18: Entradas nos braços fechados do labirinto em cruz elevado para camundongos fêmeas das linhagens C57BL/6J e *Swiss*. Resultados expressos como média + e.p.m. Teste t de *Student* não pareado.

As fêmeas da linhagem *Swiss* apresentam maior frequência de execução [T(30) = 3,750; $p = 0,000003$] e duração [T(30) = 9,768; $p = 0,0000001$] dos comportamentos de avaliação de risco que as fêmeas da linhagem C57BL/6J, como mostra a figura 19.

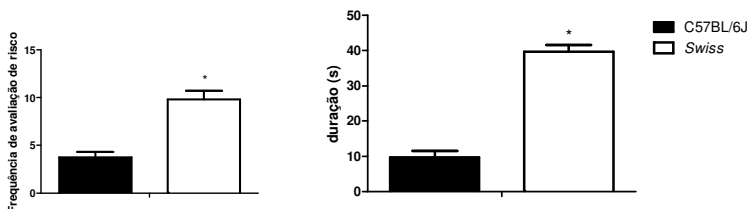


Figura 19: Frequência de execução e duração dos comportamentos de avaliação de risco no labirinto em cruz elevado em camundongos fêmeas das linhagens C57BL/6J e *Swiss*. Resultados expressos como média + e.p.m. Teste t de *Student* não pareado.* valores de $p < 0,05$.

Na figura 20 observamos que os diferentes protocolos de estresse promoveram efeitos discretos nas medidas espaço-temporais de camundongos C57BL/6J e *Swiss* fêmeas no LCE. Observamos apenas uma tendência à diminuição nas entradas relativas nos braços abertos [T (13) = 1,978; $p = 0,07$] em fêmeas *Swiss* quando submetidas ao protocolo de estresse repetido por três dias.

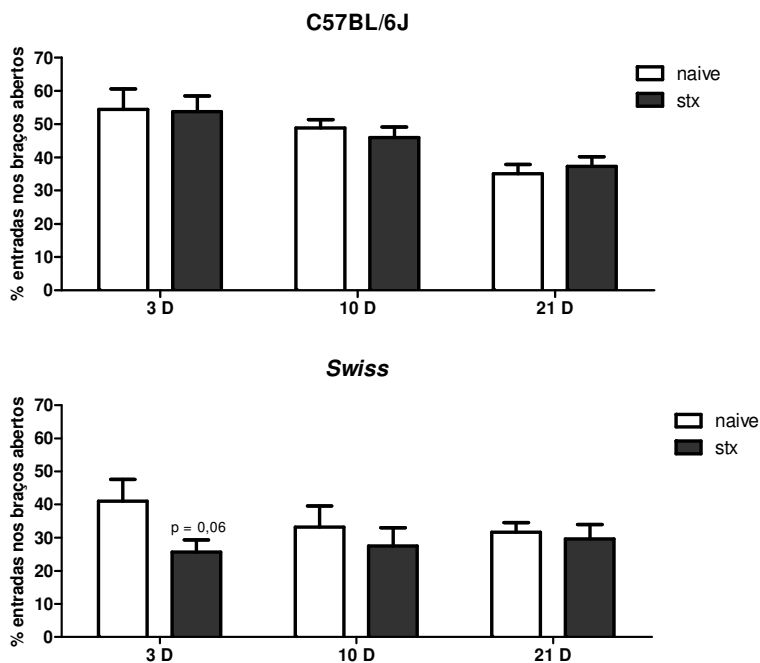


Figura 20: Efeitos dos protocolos de estresse repetido sobre as entradas nos braços abertos do LCE de camundongos fêmeas das linhagens *Swiss* (painel inferior) e *C57BL/6J* (painel superior). Resultados expressos como média + e.p.m. Teste t de *Student* não pareado.

Nenhum dos protocolos de estresse repetido realizados foi capaz de alterar o tempo de permanência nos braços abertos, em porcentagem, em camundongos fêmeas das linhagens *Swiss* e *C57BL/6J* (figura 21).

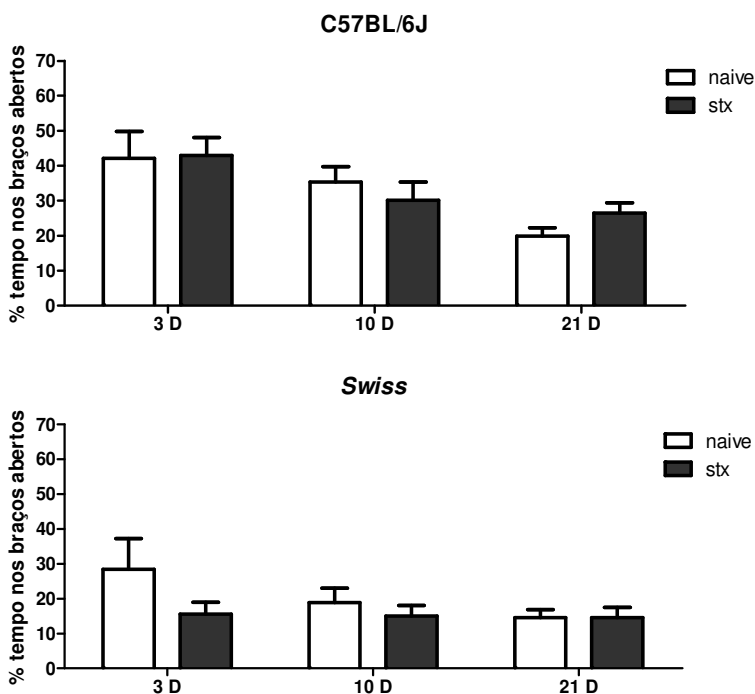


Figura 21: Efeitos dos protocolos de estresse repetido sobre o tempo de permanência nos braços abertos do LCE de camundongos fêmeas das linhagens *Swiss* (painel inferior) e *C57BL/6J* (painel superior). Resultados expressos como média + e.p.m. Teste t de *Student* não pareado.

No comportamento de avaliação de risco (figura 22) não encontramos diferenças significativas nos animais submetidos ao protocolo de estresse repetido por 10 [B6: $T(11) = -1,486$; $p = 0,17$; $p = 0,38$; *Swiss*: $T(14) = -0,802$; $p = 0,44$] ou três dias [B6: $T(15) = 1,685$; $p = 0,11$; *Swiss*: $T(13) = -0,918$; $p = 0,38$]. Os animais que foram submetidos ao protocolo de 21 dias apresentaram respostas opostas. Enquanto as fêmeas *Swiss* apresentam uma tendência ao aumento na execução destes comportamentos [$T(20) = -1,972$; $p = 0,06$], as fêmeas *C57BL/6J* apresentam uma redução significativa do mesmo parâmetro [$T(28) = 2,530$; $p = 0,02$].

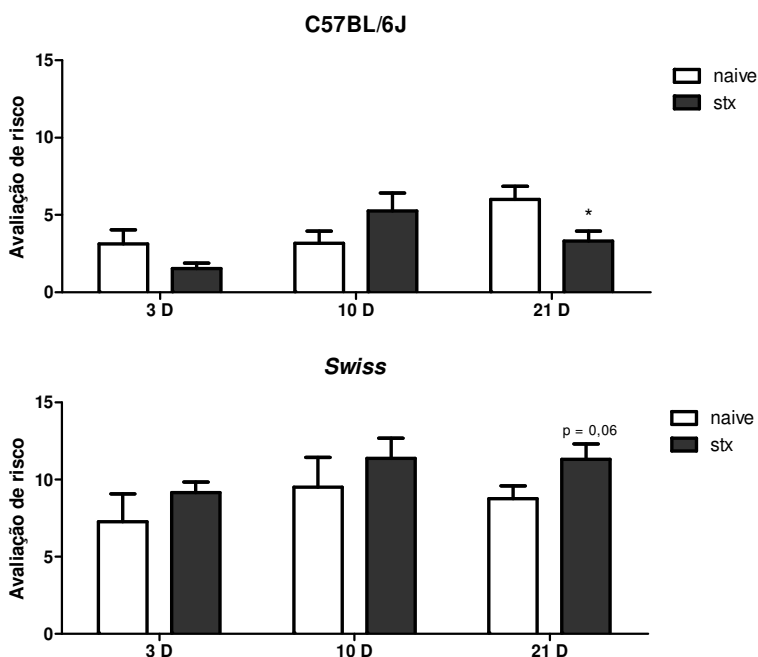


Figura 22: Efeitos dos protocolos de estresse repetido sobre a frequência de execução dos comportamentos de avaliação de risco camundongos fêmeas das linhagens *Swiss* (painel inferior) e *C57BL/6J* (painel superior) expostos ao labirinto em cruz elevado. Resultados expressos como média + e.p.m. Teste t de *Student* não pareado. * valores de $p < 0,05$.

Na figura 23 está representado o parâmetro relacionado à atividade locomotora no LCE, ou seja, as entradas nos braços fechados do LCE, onde nenhum dos protocolos de estresse repetido foi capaz de alterar este parâmetro em nenhuma das linhagens testadas.

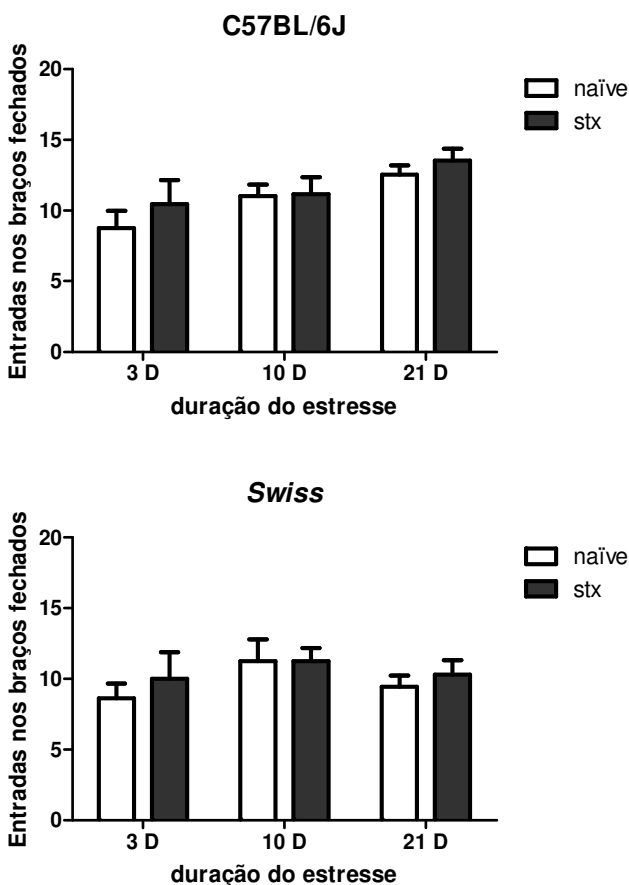


Figura 23: Efeitos dos protocolos de estresse repetido sobre a frequência de entradas nos braços fechados de camundongos fêmeas das linhagens *Swiss* (painel inferior) e *C57BL/6J* (painel superior) expostos ao labirinto em cruz elevado. Resultados expressos como média + e.p.m. Teste t de *Student* não pareado.

Na tabela 3 observamos os valores dos outros parâmetros etológicos medidos no labirinto em cruz elevado das fêmeas *Swiss*. Observamos apenas uma tendência à diminuição nos mergulhos de cabeça após o protocolo de estresse repetido por três dias [$T(13) = 2,023$; $p = 0,06$].

Tabela 3: Parâmetros etológicos avaliados no labirinto em cruz elevado em camundongos fêmeas *Swiss* após os protocolos de estresse repetido por três, 10 e 21 dias.

<i>Swiss</i>														
	<u>Repetido 3D</u>			<u>Repetido 10D</u>			<u>Repetido 21D</u>							
	Naive		Stx	Naive		Stx	Naive		Stx					
	Média	e.p.m.	Média	e.p.m.	Média	e.p.m.	Média	e.p.m.	Média	e.p.m.	Média	e.p.m.	Média	e.p.m.
SAP-t	25,93	7,01	29,37	4,77	SAP-t	33,34	5,76	35,61	5,93	SAP-t	49,57	6,23	58,89	5,54
HD	<u>9,88</u>	<u>2,67</u>	<u>3,71</u>	<u>1,11</u>	HD	9,13	1,17	9,13	2,14	HD	5,58	0,90	4,60	1,23
R	10,38	2,11	11,43	2,15	R	6,50	0,91	9,00	1,25	R	7,50	1,12	5,50	1,19
GROO-f	0,75	0,25	0,86	0,34	GROO-f	0,25	0,25	0,50	0,27	GROO-f	0,33	0,14	0,20	0,20
GROO-t	7,61	3,35	5,73	2,94	GROO-t	2,06	2,06	2,73	1,84	GROO-t	1,19	0,62	0,44	0,44

Teste t de Student não pareado. Negrito -valores de $p < 0,05$ e Sublinhado- valores de p entre 0,05 e 0,09.
 SAP-t: duração de avaliação de risco; HD: *head dipping*, ou imersão de cabeça; R: *rearing*, ou levantamento; GROO-f: frequência de *grooming*, ou autolimpieza; GROO-d: duração de *grooming*, ou autolimpieza.

De maneira semelhante, na tabela 4 observamos os mesmos parâmetros para as fêmeas C57BL/6J onde encontramos uma diminuição significativa na duração de execução dos comportamentos de avaliação de risco após o protocolo repetido por 21 dias [T (28) = 2,710; $p = 0,01$]. No protocolo de estresse repetido três dias há um aumento significativo dos comportamentos de autolimpeza [T (15) = -2,549; $p = 0,02$] e tendência a aumento nos levantamentos [T (15) = -2,080; $p = 0,06$].

Tabela 4. Parâmetros etológicos avaliados no labirinto em cruz elevado em camundongos fêmeas C57BL/6J após os protocolos de estresse repetido por três, 10 e 21 dias.

B6														
Repetido 3D					Repetido 10D					Repetido 21D				
	Naive					Naive					Naive			
	Média	e.p.m.	Média	e.p.m.	Média	e.p.m.	Média	e.p.m.	Média	e.p.m.	Média	e.p.m.	Média	e.p.m.
SAP-t	5,73	1,68	3,06	0,84	SAP-t	6,67	1,71	9,92	1,97	SAP-t	16,26	2,66	7,76	1,67
HD	4,13	1,09	3,67	1,19	HD	6,00	1,06	6,86	1,70	HD	2,40	0,48	3,80	0,68
R	5,13	1,46	10,00	1,79	R	8,50	1,38	12,86	1,87	R	6,87	1,09	9,40	1,08
GROO-f	0,25	0,16	1,00	0,24	GROO-f	1,00	0,45	1,14	0,14	GROO-f	0,33	0,13	0,47	0,17
GROO-t	2,10	1,37	2,76	0,56	GROO-t	4,59	2,53	5,02	1,20	GROO-t	1,09	0,53	1,07	0,40

Teste t de Student não pareado. **Negrito** -valores de p < 0,05 e Sublinhado- valores de p entre 0,05 e 0,09.
SAP-t: duração de avaliação de risco; HD: *head dipping*, ou imersão de cabeça; R: *rearing*, ou levantamento; GROO-f: frequência de *grooming*, ou autolimpeza; GROO-d: duração de *grooming*, ou autolimpeza.

4.3. CONSUMO DE SACAROSE

Quando combinamos os valores dos animais *naïve* dos protocolos repetidos 10 e 21 dias e comparamos as linhagens, encontramos uma menor preferência por sacarose 0,8% dos animais da linhagem *Swiss* [$T(37) = 2,043$; $p = 0,048$] como demonstrado na figura 24.

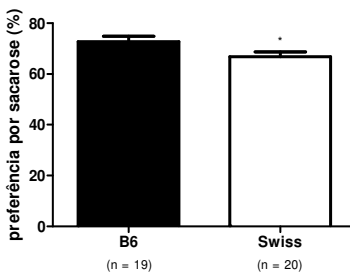


Figura 24: Preferência por uma solução de sacarose de camundongos *naïve* C57BL/6J (B6) e *Swiss* fêmeas. Resultados expressos em média + e.p.m. Teste t de *Student* não pareado. * valores de $p < 0,05$.

No protocolo de preferência pela sacarose apenas o estresse repetido 21 dias na linhagem C57BL/6J foi capaz de reduzir significativamente a preferência dos animais de sacarose sobre água [$T(26) = 4,362$; $p = 0,0002$] como podemos observar na figura 25.

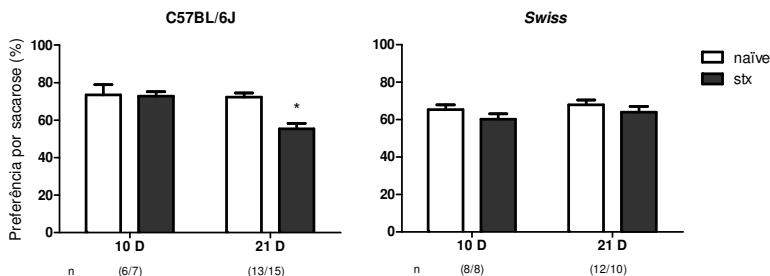


Figura 25: Efeito do estresse repetido 10 e 21 dias sobre a preferência por uma solução de sacarose 0,8% sobre água em camundongos C57BL/6J e *Swiss* fêmeas. Resultados expressos em média + e.p.m. Teste t de *Student* não pareado. * valores de $p < 0,05$.

4.4. CORTICOSTERONA PLASMÁTICA

A ANOVA de duas vias revelou diferença significativa entre as concentrações plasmáticas de corticosterona no fator linhagem ($F(1, 40) = 16,530$, $p = 0,00022$), no fator grupos experimentais ($F(6, 40) = 5,0449$, $p = 0,00062$) e na interação entre os dois fatores ($F(6, 40) = 3,8078$; $p = 0,00429$). A análise *post hoc* de Newman-Keuls indicou uma diferença entre os animais *naïves* das duas linhagens e também entre os estressados 24h antes da decapitação. Na linhagem C57BL/6J o grupo estressado 1h antes da eutanásia apresentou uma redução significativa dos níveis de corticosterona plasmática e uma aparente redução no grupo 6h ($p = 0,08$). Na linhagem *Swiss* há um aumento significativo dos níveis plasmáticos de corticosterona apenas no grupo submetido ao estresse repetido (3 dias), como ilustrado na figura 26.

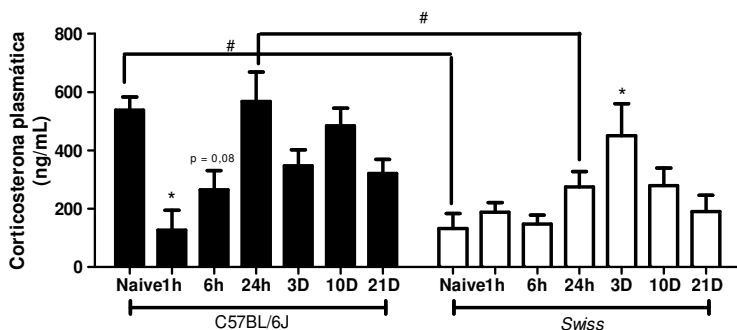


Figura 26: Concentração de corticosterona plasmática (ng/mL) de camundongos fêmeas das linhagens *Swiss* e C57BL/6J submetidas aos diferentes protocolos de estresse ($n = 4/\text{grupo}$). Resultados expressos como média + e.p.m. ANOVA de duas vias seguida do *post hoc* de Newman-Keuls. * valores de $p < 0,05$ em comparação ao grupo *naïve* as mesma linhagem. # valores de $p < 0,05$ em comparação ao mesmo grupo da outra linhagem.

5. DISCUSSÃO

A influência de fatores genéticos sobre o comportamento de roedores ganhou especial atenção no final década de 1990 com o surgimento dos animais transgênicos. Diversos grupos de pesquisa (p. ex.: PAYLOR; CRAWLEY, 1997; TARANTINO et al., 2000; BROOKS et al., 2005) começaram a chamar a atenção para a importância do *background* genético nas diferentes linhagens isogênicas utilizadas no desenvolvimento de animais transgênicos e como essa diferença poderia influenciar na análise dos resultados encontrados nos diferentes estudos.

No Brasil a linhagem de camundongos heterogênica *Swiss* é a mais utilizada na pesquisa biomédica (SILVA, 2011). Porém, de nosso conhecimento, existem poucos trabalhos que comparem animais da linhagem *Swiss* com linhagens isogênicas (ROMEO et al., 2012; YALSIN; BELZUNG; SURGET, 2008).

Os camundongos *Swiss* apresentam maior amplitude de sobressalto em todas as intensidades de estímulo, uma menor exploração dos braços abertos associada a um aumento dos comportamentos de avaliação de risco e uma menor preferência por uma solução de sacarose 0,8%, quando comparados aos C57BL/6J. Estas diferenças entre as linhagens podem ser devidas a diferenças no sistema límbico das duas linhagens, pois a influência deste sistema sobre os comportamentos relacionados a ansiedade, avaliados no labirinto em cruz elevado (SILVEIRA; SANDNER; GRAEFF, 1993; MORAES; BERTOGLIO; CAROBREZ, 2008; STERN et al., 2010), e a depressão, avaliados pelo consumo de sacarose (STAMFORD et al., 1991; PAPP; KLIMEK; WILLNER, 1994; MAZARATI et al. 2007) são conhecidos. Além disso, o sistema auditivo envia projeções ao sistema límbico, principalmente à amígdala e ao hipocampo (KRAUS; CANLON, 2012), logo alterações no sistema límbico poderiam alterar o processamento auditivo e consequentemente a resposta de sobressalto.

No teste de preferência por sacarose, camundongos *Swiss* machos apresentam em torno de 70% de preferência por soluções de sacarose a 1 e 2% e cerca de 80% de preferência por uma solução a 4% (SILVA; TAKAHASHI, 2012 - comunicação pessoal). Esses dados indicam que a diferença no consumo de sacarose entre a fêmeas das linhagens

C57BL/6J e *Swiss* pode ser influenciada por uma menor sensibilidade da linhagem *Swiss* em diferenciar soluções palatáveis como já demonstrado entre diferentes linhagens de ratos (GRIFFITHS; SHANKS; ANISMAN, 1992).

Na literatura encontramos diversos trabalhos que exploram a diferença dos comportamentos relacionados à ansiedade entre diferentes linhagens de camundongos, mas nenhum deles comparando as linhagens *Swiss* e C57BL/6J. Por exemplo, Meziane e colaboradores (2007) mostraram que camundongos fêmeas da linhagem BALB/cByJ apresentam comportamento do tipo-ansioso no campo aberto (passam menos tempo no centro do aparato) em relação às fêmeas de C57BL/6J. Xiao-Lei e colaboradores (2011) também apresentam dados semelhantes no campo aberto na comparação entre machos e fêmeas C57BL/6J e BALB/cJ e, no labirinto em cruz elevado, os C57BL/6J passam mais tempo nos braços abertos que os BALB/cJ, havendo influência do sexo apenas para os C57BL/6J. Brooks e colaboradores (2005) encontraram que C57BL/6J apresentam comportamento intermediário no labirinto em cruz elevado em relação às outras linhagens, sendo que C3H/He e DBA/Ca passam mais tempo nos braços abertos, enquanto as linhagens DBA/2, BALB/c e 129S2/Sv passam menos tempo nestes braços, e apresentam índice de atividade acima de 60% tempo na caixa de atividade. Em nossos resultados observamos que os animais da linhagem C57BL/6J apresentaram uma maior exploração das áreas aversivas do aparato, indicando um comportamento comparativamente menos ansioso que os da linhagem *Swiss*.

A amplitude do sobressalto pode ser influenciada pela a massa corpórea dos animais, como o observado entre ratos Wistar e *hooded* por Blaszczyk e Tajchert (1996), porém Willot e colaboradores (2003) não encontraram qualquer relação entre a massa corpórea e a resposta dos camundongos, mas sugerem que esta diferença esteja relacionada às diferenças genéticas encontradas entre as linhagens. Esses pesquisadores realizaram um extenso trabalho de comparação das respostas de sobressalto em 40 linhagens isogênicas de camundongos, encontrando grande variação entre elas e influência do gênero apenas nas linhagens C57BL/10J, SPRET/Ei e SWR/J. Os mesmos pesquisadores sugerem que esta diferença esteja relacionada às diferenças genéticas

nas vias de processamento auditivo centrais, necessárias para desencadear a resposta de sobressalto.

Investigando o potencial controle genético sobre a resposta de sobressalto, Joobar e colaboradores (2002) encontraram 15 QTLs associados a diferentes fenótipos no sobressalto acústico em linhagens derivadas de C57BL/6J e A/J. A análise de QTL tem como objetivo mapear genes envolvidos em uma determinada característica através da detecção de associações significativas entre o fenótipo de interesse e marcadores moleculares ao longo do genoma (MOISAN; RAMOS, 2010).

O prejuízo auditivo também poderia influenciar esta resposta. Porém, Willot e colaboradores (1994) estabeleceram que a perda auditiva que ocorre em camundongos C57BL/6J, com o envelhecimento, é significativa apenas a partir dos cinco meses de idade. Além disso, não existem dados, de nosso conhecimento, relacionando uma maior acuidade auditiva de animais da linhagem Swiss. Portanto, acreditamos que esta não seja a razão da diferença entre linhagens aqui encontrada.

Paylor and Crawley (1997) realizaram uma extensa comparação entre machos de linhagens isogênicas (C57BL/6J, C57BL/10J, 129/J, 129/SvJ, 129/SvEvTac, A/J, AKR/J, BALB/cByJ, BUB/BnJ, C3H/HeJ, DBA/2J e ST/bJ) no sobressalto acústico basal e na inibição pelo pré-pulso da resposta de sobressalto (PPI). Dentre estas linhagens, a C57BL/10J apresenta a maior resposta de sobressalto, e a 129/SvJ, a menor. Em uma faixa de estímulo variando de 70 a 120 dB todas as linhagens apresentaram respostas crescentes conforme o aumento da intensidade do estímulo, mas com diferentes limiares (78 a 100 dB). Brooks e colaboradores (2004) analisaram o comportamento de seis linhagens isogênicas em diversos testes para atividade motora, no sobressalto acústico e na PPI, e observaram que os machos C57BL/6J tem a menor resposta de sobressalto quando comparados aos das linhagens 129S2/Sv, BALBc, DBA/2, CBA/Ca e C3H/HE, com o limiar da resposta de sobressalto variando entre 95 e 105 dB nessas linhagens.

Em nossos resultados não observamos esta relação direta entre a intensidade do estímulo e a amplitude da resposta de sobressalto e encontramos um limiar de resposta mais baixo (70 dB) para os C57BL/6J do que os encontrados por Paylor e Crawley (100 dB) e por Brooks e colaboradores (95 dB). Um fator a ser considerado é origem

dos animais, a linhagem em comum entre nosso estudo e os outros dois mencionados foram obtidas de diferentes fontes (*Jackson Laboratory*, EUA, *Harlan Ritcher*, Reino Unido e *UNISUL*, Brasil), sendo possível que os animais da linhagem C57BL/6J apresentem fenótipos levemente diferentes devido a variações nas colônias de origem.

As diferenças no clima, ambiente de avaliação e local onde os testes foram realizados também podem alterar os resultados encontrados como demonstrado por Ritcher e colaboradores (2011) quando avaliaram o comportamento de camundongos fêmeas das linhagens C57BL/6NCrI e DBA/2NCrI provenientes da mesma fonte (*Charles River Laboratories*, Alemanha). Estes pesquisadores observaram que o comportamento dos animais difere quando testados nas mesmas condições e testes, mas em diferentes laboratórios.

Pauly, Ullman e Collins (1990) encontraram diferença no sobressalto acústico entre animais falso-operados e adrenalectomizados apenas na linhagem isogênica BUB/J. Esta linhagem apresentou um aumento da resposta de sobressalto nos animais adrenalectomizados, enquanto nenhum efeito foi observado nas linhagens A/J, C57BL/6lbg e DBA/2lbg. Uma redução na resposta de sobressalto após um protocolo estresse foi relatado em machos de C57BL/6J após o protocolo de estresse crônico imprevisível (quatro semanas) por Mineur, Belzung e Crusio (2006). Uma resposta reduzida ao sobressalto foi encontrada em ratos machos por Conti e Printz (2003) após um protocolo de estresse repetido (20 minutos de contenção por cinco dias), enquanto Bourke e Neigh (2012) relataram um aumento na resposta de sobressalto de ratos fêmeas submetidos a um protocolo de agressão maternal por seis dias. Em nossos resultados, observamos uma redução na resposta de sobressalto no grupo estressado em relação aos animais *naïve* após o estresse repetido por 21 dias nas fêmeas C57BL/6J e uma hora após o estresse agudo nas fêmeas *Swiss*. Nenhuma alteração neste parâmetro foi encontrada nos outros protocolos experimentais.

Observamos que os animais da linhagem C57BL/6J apresentam alterações comportamentais em todos os testes realizados após o estresse repetido por 21 dias, enquanto os da linhagem *Swiss* apresentaram apenas um efeito tipo-ansiosgênico discreto no labirinto em cruz elevado, após o mesmo protocolo. Esta diferença pode estar relacionada à heterogeneidade encontrada na linhagem *Swiss*,

esperada no caso de linhagens não isogênicas cujo *background* genético é extremamente variado devido aos cruzamentos aleatórios, se aproximando ao que ocorre na espécie humana. Assim, nesta população de animais heterogênicos ou *outbred* devem existir indivíduos pouco responsivos ao estresse e outros muito responsivos levando, consequentemente, a uma maior variabilidade no comportamento desta linhagem.

Os efeitos da variabilidade genética presente em linhagens heterogênicas foram demonstrados por diversos pesquisadores como, por exemplo, Kazlauskas e colaboradores (2011) que estudaram camundongos CF1 machos. Estes foram separados por seu nível de atividade no campo aberto em dois fenótipos: alta atividade (AA) e baixa atividade (BA). O estresse subcrônico (15 dias) imprevisível diminui a atividade exploratória dos dois fenótipos, mas não alterou o tempo de imobilidade no teste de suspensão pela cauda nem a preferência por sacarose. Observou-se uma diferença nos níveis de corticosterona sérica basais entre os fenótipos, sendo mais baixos nos animais AA e apenas nesse grupo houve a elevação após o estresse. Os níveis de BDNF hipocampal também se encontravam diferentes na condição basal, sendo menores no grupo de BA. Porém, após o estresse, apenas os níveis de BDNF do grupo de AA diminuíram, o que pode ser devido a um efeito piso (os níveis de BDNF já seriam os mais baixos possíveis) no fenótipo BA.

De maneira semelhante a humanos, animais também exibem estratégias de *coping* ativas, caracterizadas por comportamentos defensivos e exploratórios, e passivas, como submissão, imobilidade e congelamento (FRANKLIN; SAAB; MANSUY, 2012). Por exemplo, Mozhui e colaboradores (2010) compararam as linhagens C57BL/6J, 129S1, A/J, BALB/cJ, BALB/cByJ e DBA/2J após o estresse de contenção por 10 dias. Estes pesquisadores encontraram um aumento nos níveis de corticosterona plasmática em todas as linhagens após o período de estresse e uma redução da massa corpórea em todas as linhagens, exceto a 129S1. Os resultados encontrados sugerem que, frente a uma situação de estresse, os animais da linhagem DBA/2J apresentam um *coping* passivo, caracterizado por uma redução da exploração da área clara da caixa claro-escuro e dos braços abertos do labirinto em cruz elevado, enquanto os C57BL/6J exibem um *coping* ativo, caracterizado por um aumento na exploração destas regiões. Nossos resultados vão

de encontro com os achados por estes pesquisadores já que as fêmeas de C57BL/6J apresentaram uma diminuição do comportamento de avaliação de risco indicando, uma redução do conflito aproximação-esquiva.

Mozhui e colaboradores (2010) encontraram um aumento da exploração da área clara da caixa claro-escuro e dos braços abertos do labirinto em cruz elevado após 10 dias de estresse de contenção em camundongos C57BL/6J machos (*coping* ativo), enquanto Mineur, Belzung e Crusio (2006) não encontraram qualquer diferença neste aparato em camundongos C57BL/6J machos e fêmeas após o estresse crônico imprevisível. Já Adamec e colaboradores (2006) mostraram uma redução na exploração e permanência nos braços abertos de camundongos C57BL/6J machos e fêmeas expostos ao predador (gato). Santos (2011) encontrou uma diminuição no número de cruzamentos no campo aberto em camundongos *Swiss* machos submetidos ao estresse agudo de contenção no frio. Camundongos ddY apresentam uma menor exploração dos braços abertos após o estresse de exposição repetida ao frio (HATA et al., 2001; NISHIKAWA et al., 2004). O estresse de contenção diminuiu a exploração dos braços abertos em camundongos ICR machos (WANASUNTRONWONG et al., 2012), exemplos de uma estratégia de *coping* passiva.

Em nosso protocolo as fêmeas C57BL/6J não apresentaram nenhuma alteração na exploração dos braços abertos do labirinto em cruz elevado, enquanto as fêmeas *Swiss* apresentaram uma tendência à redução deste parâmetro após o estresse repetido. Em relação ao comportamento de avaliação de risco encontramos uma redução deste comportamento nas fêmeas C57BL/6J e uma tendência a diminuição nas fêmeas *Swiss* após o estresse 21 D. Nenhum dos protocolos de estresse realizados alteraram os índices de exploração (entradas nos braços fechados) neste aparato. Indicando que as fêmeas da linhagem C57BL/6J engajam em uma estratégia de *coping* ativa enquanto as fêmeas da linhagem *Swiss* exibem comportamentos característicos de um *coping* passivo.

Golden e colaboradores (2011) encontraram, em um protocolo crônico (10 dias) de derrota social, que 35% dos machos C57BL/6J utilizados no estudo eram resilientes, ou seja, não apresentavam esquiva social, contra quase 100% das linhagens CD1 e FVB.

Yalsin, Belzung e Surget (2008) sugerem que os animais da linhagem heterogênica *Swiss* são resilientes ao estresse crônico imprevisível (seis semanas), quando comparados aos da linhagem isogênica BALB/c. Esse protocolo não provocou nenhuma alteração na pelagem de *Swiss*, mas causou deterioração nos BALB/c. Esta deterioração foi revertida pelo tratamento com fármacos antidepressivos como imipramina, desipramina, fluoxetina e maprotilina. No *splash test*, que consiste em borrifar uma solução de sacarose 10% no dorso dos animais e analisar os comportamentos de autolimpeza, ou *grooming*, por cinco minutos, os camundongos *Swiss* não apresentaram nenhuma alteração enquanto os BALB/c apresentaram uma redução no *grooming* que foi revertida por antidepressivos (fluoxetina e imipramina).

Porém, animais resilientes não estão isentos de sintomas aparentemente mal-adaptativos, mas também exibem sinais claros de resistência em outros aspectos (RUSSO et al., 2012). Os resultados encontrados no consumo de sacarose mostram uma redução na preferência pela solução de sacarose 0,8% nas fêmeas C57BL/6J submetidas ao estresse de 21 dias. O consumo de sacarose é utilizado como uma medida de anedonia, e diversos trabalhos encontram uma redução na preferência por uma solução palatável após protocolos de estresse (BOURKE; NEIGH, 2012; CREMA et al., 2012; DUBREUCQ et al., 2012), enquanto outros não encontram nenhuma alteração neste parâmetro (KAZLAUCKAS et al., 2011; ADAMEC et al., 2006).

Scklarczyk e colaboradores (2011) compararam respostas comportamentais ao estresse e a expressão dos genes *Fkbp5*, *Tsc22d3*, *Nfkb1a*, *PlatPdyn*, *Crhr1* e *Hprt* no hipocampo e na amígdala de camundongos de diferentes linhagens isogênicas. As diferenças no comportamento associadas às diferenças na expressão gênica encontradas neste trabalho corroboram a hipótese de um controle gênico complexo das respostas comportamentais ao estresse.

Para melhor entender as diferenças na responsividade ao estresse das duas linhagens utilizadas no presente trabalho, realizamos a dosagem de corticosterona plasmática. Nossos resultados mostraram que entre os grupos *naïves* as fêmeas de C57BL/6J apresentaram níveis mais elevados de corticosterona, quando comparados aos animais da linhagem *Swiss*, indicando uma diferença genética no controle circadiano de secreção de corticosterona. De maneira semelhante,

Jones e colaboradores (1998) mostraram uma diferença nos níveis basais de corticosterona e no padrão temporal de resposta ao estresse de contenção entre machos e fêmeas das linhagens isogênicas C57BL/6 e DBA/2, sem encontrar qualquer diferença relacionada ao gênero dos animais. Por outro lado, Nesher e colaboradores (2012) não encontraram diferenças entre os níveis plasmáticos de corticosterona de machos das linhagens heterogênicas Sabra e ICR das linhagens isogênicas C57BL/6J e BALB/c. Mozhui e colaboradores (2010) compararam que as linhagens C57BL/6J, 129S1, A/J, BALB/cJ, BALB/cByJ e DBA/2J também não encontraram diferenças nos níveis basais de corticosterona entre estas linhagens.

O único trabalho de nosso conhecimento que utiliza as linhagens *Swiss* e C57BL/6J, além da linhagem BALB/c é o de Romeo e colaboradores (2012), porém estes pesquisadores não fazem comparações diretas entre os gêneros nem entre as linhagens. Mas podemos observar que os níveis de corticosterona basais das fêmeas C57BL/6J e *Swiss* estão em torno de 100 ng/mL, enquanto das fêmeas de BALB/c estão em torno de 200 ng/mL. Nossos dados da linhagem *Swiss* estão de acordo com os encontrados por estes pesquisadores, enquanto os da linhagem C57BL/6J apresentam níveis bem mais elevados do que os descritos eles. Em uma rápida busca na literatura encontramos níveis de corticosterona de aproximadamente 100 ng/mL em fêmeas (JONES et al, 1998) e valores variando de 45 ng/dL a 5 µg/dL em machos (DELGADO-MORALES, 2012 ; LONGORDO et al., 2011; GIBB et al., 2011). Esta diferença pode estar relacionada a alterações no ambiente de alojamento ou a uma alteração específica da ninhada e precisa ser melhor investigada.

Os níveis de corticosterona nos diferentes grupos foram comparados aos animais *naïve*, estando significativamente reduzidos uma hora após o estresse e apresentando uma tendência à diminuição após 6h, estando normalizados em relação ao controle 24 h após o estresse. Nos grupos de estresse repetido esses níveis se encontram inalterados em relação aos animais *naïve*, como esperado pelo processo de adaptação.

O padrão de respostas hormonais das fêmeas *Swiss* seguiu o esperado, apresentando níveis basais semelhantes aos encontrados na literatura. Porém, as fêmeas não apresentaram uma elevação dos níveis de corticosterona uma hora após a contenção, como o descrito

por Romeo e colaboradores (2012). Foi necessária a persistência do estressor por três dias para que ocorresse uma elevação significativa dos níveis plasmáticos de corticosterona, que foi seguida pela adaptação da resposta com a persistência do estressor por 10 e 21 dias.

Podemos observar diferenças na regulação do eixo HPA entre as duas linhagens utilizadas nesse estudo já que entre os grupos que foram submetidos aos protocolos de estresse o maior pico ocorre 24h após o estresse agudo na linhagem C57BL/6J, mas apenas após o protocolo repetido na linhagem *Swiss*. As alterações comportamentais encontradas após o estresse repetido por 21 dias na linhagem C57BL/6J não parecem estar relacionadas aos níveis plasmáticos de corticosterona já que esses não apresentaram alterações em comparação aos *naïves*, assim como a redução da resposta de sobressalto acústico encontrada nas fêmeas da linhagem *Swiss* uma hora após o estresse não parece relacionada a alterações correspondentes nos níveis de corticosterona plasmática. Logo investigações funcionais do sistema límbico são necessárias para explicar as diferentes respostas comportamentais ao estresse encontradas.

Além disso, apesar da maior incidência de transtornos ansiosos e depressivos em mulheres a maioria dos trabalhos utiliza animais de experimentação machos, isso ocorre principalmente devido à variação hormonal que as fêmeas apresentam durante o ciclo estral. Esta flutuação hormonal pode alterar o comportamento desses animais e dificultar a comparação entre dados de diferentes grupos (MEZIANE et al., 2007). Observamos o perfil de respostas de animais nas quatro fases do ciclo e vimos que não há diferença entre proestro, estro, metaestro e diestro no teste de sobressalto acústico, como previamente descrito por Plappert, Rodenbüncher & Pilz (2005) para C57BL/6J e C3H, e por Meziane e colaboradores (2007) comparando C57BL/6J e BALB/cByJ. No teste de consumo de sacarose a análise da influência do ciclo fica complicada devido à duração do teste (72h), que não permite a análise de cada fase separadamente. Já no labirinto em cruz elevado existem diversos trabalhos na literatura que mostram a influência do ciclo estral sobre o comportamento de roedores neste teste (MARCONDES et al., 2001; KONCE; WALF; FRYE, 2012).

Outro dois testes foram também realizados neste trabalho, o teste da suspensão pela cauda e do campo aberto (dados não

mostrados). Foram vistas alterações apenas na linhagem C57BL/6J após o protocolo de 21 dias em ambos os testes. No teste da suspensão pela cauda encontramos um grande problema na análise dos resultados, pois 30,8% das fêmeas C57BL/6J *naïve* escalaram a cauda, enquanto nenhuma das *Swiss* o fez e 37% das fêmeas C57BL/6J submetidas aos protocolos de estresse escalaram a cauda contra 7,7% das fêmeas *Swiss*. O comportamento de escalar a cauda significa que o animal encontrou uma estratégia de fuga da situação aversiva em que se encontra e deve, portanto, ser excluído da análise dos dados (MAYORGA; LUCKI, 2001). Outros pesquisadores relataram o mesmo problema com esta linhagem (MILLER et al, 2010; CROWLEY; BLENDY; LUCKI, 2005), inclusive Mayorga e Lucki (2001) dedicaram um trabalho para explorar as limitações do uso de algumas linhagens isogênicas no teste da suspensão pela cauda, entre elas a C57BL/6J e a C57BL/6N, e encontraram que este comportamento não é devido a alterações fenotípicas de uma população específica e que apresenta latência curta, além de ocorrer independentemente da posição em que o animal é fixado.

6. CONCLUSÃO

Os protocolos de imobilização no frio parecem ser ferramentas úteis no estudo da resiliência, visto que de todas as alterações encontradas apenas a redução da preferência por sacarose, após o estresse repetido por 21 dias, pode ser considerada um efeito mal-adaptativo.

Após o estresse, as fêmeas C57BL/6J engajam em estratégias de *coping* ativas nos testes relacionados à ansiedade (labirinto em cruz elevado e sobressalto acústico) enquanto as fêmeas *Swiss* tendem a adotar estratégias mais passivas, como a diminuição da exploração dos braços abertos e um aumento nos comportamentos de avaliação de risco.

Podemos deduzir também que existem diferenças no sistema límbico entre as duas linhagens aqui estudadas, pois os camundongos *Swiss* apresentam maior amplitude de sobressalto em todas as intensidades de estímulo, uma menor exploração dos braços abertos associada a um aumento dos comportamentos de avaliação de risco e uma menor preferência por uma solução de sacarose 0,8%, quando comparados aos C57BL/6J.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- <<http://www.dsm5.org/ProposedRevision.aspx>>**APA DSM-5**. Acessado em 14 de setembro de 2011.
- <<http://www.who.int/classifications/icd/en/bluebook.pdf>>. Acessado em 3 de janeiro de 2013.
- ADAMEC, R. et al. Lasting anxiogenic effects of feline predator stress in mice: Sex differences in vulnerability to stress and predicting severity of anxiogenic response from the stress experience. **Physiology and Behavior**, v. 88, p. 12-29, 2006.
- BANGASSER, D. A.; VALENTINO, R. J. Sex differences in molecular and cellular substrates of stress. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 32, p. 709-723, 2012.
- BARLOW, D. H.; DURAND, V. M. **Psicopatologia: uma abordagem integrada**. 4ª ed, São Paulo. Cengage Learning, 2008.
- BECKER, J. B. et al. Stress and disease: is being a female a predisposing factor? **The Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 44, p. 11851-11855, 2007.
- BLASZCZYK, J.; TAJCHERT, K. Sex and strain differences of acoustic startle reaction development in adolescent albino Wistar and hooded rats. **Acta Neurobiologiae Experimentalis**, v. 56, p. 919-925, 1996.
- BOURKE, C. H.; NEIGH, G. N. Exposure to repeated maternal aggression induces depressive-like behaviour and increases startle in adult female rats. **Behavioral Brain Research**, v. 227, p. 270-275, 2012.
- BRESLAU, N. Gender differences in trauma and posttraumatic stress disorder. **The Journal of Gender-Specific Medicine**, v. 5, n. 1, p. 34-40, 2002.
- BRITO, A. S. **Manual de ensaios toxicológicos in vivo**. Campinas, SP: Editora da UNICAMP, 1994.
- BROOKS, S. P. et al. Behavioral profiles of inbred mouse strains used as transgenic background. I: motor tests. **Genes, Brain and Behavior**, v. 3, p. 206-215, 2004.
- BROOKS, S. P. et al. Behavioral profiles of inbred mouse strains used as transgenic backgrounds. II: cognitive tests. **Genes, Brain and Behavior**, v. 4, p. 307-317, 2005.
- BYERS, S. L. et al. Mouse estrous cycle identification tool and images. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, e35538, p. 1-5, 2012.

- CAHILL, L. Why sex matters for neuroscience. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, n. 6, p. 477-484, 2006.
- CARRASCO, G. A.; VAN DE KAR, L. D. Neuroendocrine pharmacology of stress. **European Journal of Pharmacology**, n. 463, p. 235-272, 2003.
- CREMA, L. M. et al. The effect of unpredictable chronic mild stress on depressive-like behavior and on hippocampal A(1) and striatal A(2A) adenosine receptors. **Physiology & Behavioral**, v. 109C, p. 1-7, 2012
- CROWLEY, J. J.; BLENDY, J. A.; LUCKI, I. Strain-dependent antidepressant-like effects of citalopram in the mouse tail suspension test. **Psychopharmacology**, v. 183, p. 257-264, 2005.
- CRYAN, J. F.; HOLMES, A. The ascent of mouse: advances in modeling human depression and anxiety. **Nature Reviews: Drug Discovery**, v. 4, p. 775-790, 2005.
- CRYAN, J. F.; MARKOU, A.; LUCKI, I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 23, p. 238-45, 2002.
- CUI, S.; CHESSON, C.; HOPE, R. Genetic variation within and between strains of outbred Swiss mice. **Laboratory Animals**, v. 27, p. 116-123, 1993.
- DEL GIUDICE, M.; ELLIS, B. J.; SHIRTCLIFF, E. A. The adaptive calibration model of stress responsivity. **Neuroscience Biobehavior Reviews**, v. 35, p. 1562-1592, 2011.
- DELGADO-MORALES, R. et al., Adrenocortical and behavioural response to chronic restraint stress in neurokinin-1 receptor knockout mice. **Physiology & Behavior**, v. 105, p. 669-675, 2012.
- DITLEVSEN, D. N.; ELKLIT, A. Gender, trauma type, and PTSD prevalence: a re-analysis of 18 nordic convenience samples. **Annals of General Psychiatry**, v. 11, n. 26, p. 1-6, 2012.
- DUBREUCQ, S. et al. Genetic dissection of the role of cannabinoid type-1 receptors in the emotional consequences of repeated social stress in mice. **Neuropsychopharmacology**, v. 37, n. 8, p. 1885-900, 2012.
- FRANKLIN, T. B.; SAAB, B. J.; MANSUY, I. M. Neural mechanisms of stress resilience and vulnerability. **Neuron**, v. 75, p. 747-761, 2012.

- GIBB, J. et al. Effects of stressors and immune activating agents on peripheral and central cytokines in mouse strains that differ in stressor responsivity. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 25, p. 468–482, 2011.
- GOLDEN, S.A. et al. A standardized protocol for repeated social defeat stress in mice. **Nature Protocols**, v. 6, p. 1183–1191, 2011.
- GRAEFF, F.G. Medicamentos ansiolíticos. In: GRAEFF, F. G., GUIMARÃES, F. S. **Fundamentos de Psicofarmacologia**. São Paulo: Atheneu, p. 123-160, 2005.
- GRIFFITHS, J.; SHANKS, N.; ANISMAN, H. Strain-specific alterations in consumption of palatable diet following repeated stressor exposure. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 42, p. 219-227, 1992.
- GUIMARÃES, F. S. Medicamentos antidepressivos e estabilizadores do humor. In: GRAEFF, F. G.; GUIMARÃES, F. S (Ed.). **Fundamentos de Psicofarmacologia**. São Paulo: Atheneu, p. 133-137, 2005.
- HATA, T. et al. Anxiety-like behavior in elevated plus-maze tests in repeatedly cold-stressed mice. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 85, n. 2, p. 189-196, 2001.
- HERMAN, J. P. et al. Limbic system mechanisms of stress regulation: Hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 29, p. 1201-1213, 2005.
- JOËLS, M.; BARAM, T. Z. The neuro-symphony of stress. **Nature Reviews: Neuroscience**, v. 10, p. 459-466, 2009.
- JONES, B. C. et al. Contribution of sex and genetics to neuroendocrine adaptation to stress in mice. **Psychoneuroendocrinology**, v. 23, n. 5, p. 505–517, 1998.
- JOOBER, R. et al. Provisional mapping of quantitative trait loci modulating the acoustic startle response and prepulse inhibition of acoustic startle. **Neuropsychopharmacology**, v. 27, p. 765-781, 2002.
- KARATSOREOS, I. N.; McEWEN, B. S. Psychobiological allostasis: resistance, resilience and vulnerability. **Trends in Cognitive Science**, v. 15, n. 12, p. 576-84, 2011.
- KAZLAUCKAS, V. et al. Distinctive effects of unpredictable subchronic stress on memory, serum corticosterone and hippocampal BDNF

- levels in high and low exploratory mice. **Behavior Brains Research**, v. 218, p. 80-86, 2011.
- KESSLER, R. C. et al. Posttraumatic stress disorder in the National Comorbidity Survey. **Archives of General Psychiatry**, v. 52, p. 1048–1060, 1995.
- KESSLER, R.C. Epidemiology of women and depression. **Journal of Affective Disorders**, v.74, n. 1, p. 5-13, 2003.
- KESSLER, R. C. et al. Twelve-month and lifetime prevalence and lifetime morbid risk of anxiety and mood disorders in the United States. **Int J Methods Psychiatr Res.**, v. 21, n. 3, p.169-84, 2012.
- KLOET, E. R.; JOËLS, M.; HOLLSBOER, F. Stress and the brain: from adaptation to disease. **Nature Reviews: Neuroscience**, v. 6, p. 463-473, 2005.
- KOONCE, C. J.; WALF, A. A.; FRYE, C. A. Type 1 5 α -reductase may be required for estrous cycle changes in affective behaviors of female mice. **Behavior Brain Research**, v. 226, n. 2, p. 376-80, 2012.
- KRAUSS, K. S.; CANLON, B. Neuronal connectivity and interactions between the auditory and limbic systems. Effects of noise and tinnitus. **Hearing Research**, v. 288, p. 34-46, 2012.
- LIMA, T. C. M. **Estresse e Convulsões: participação dos opióides endógenos**. 1991. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Universidade de São Paulo, São Paulo.
- LONGORDO, F. et al., Do Mice Habituate to “Gentle Handling”? A Comparison of Resting Behavior, Corticosterone Levels and Synaptic Function in Handled and Undisturbed C57BL/6J Mice. **Sleep**, v. 34, n. 5, 2011.
- LOVICK, T. A. Estrous cycle and stress: influence of progesterone on the female brain. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, p. 314-320, 2012.
- LYNCH, C. J. The so-called Swiss mouse. **Laboratory Animal Care**, v. 19, p. 214-220, 1969.
- MARCONDES, F. K. Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze test. **Physiology & Behavior**, v. 74, n. 4-5, p. 435-40, 2001.

- MAYORGA, A. J.; LUCKI, I. Limitations on the use of the C57BL/6 mouse in the tail suspension test. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 155, n. 1, p. 110-112, 2001.
- MAZARATI, A. et al. Kindling epileptogenesis in immature rats leads to persistent depressive behavior. **Epilepsy & Behavior**, v. 10, n. 3, p. 377–383, 2007
- McEWEN, B. S. Stressed or stressed out: What is the difference? **Journal of Psychiatry & Neuroscience**, v. 30, n. 5, p. 315-318, 2005.
- MEZIANE, H. et al. Estrous cycle effects on behavior of C57BL/6J and BALB/cByJ female mice: implications for phenotyping strategies. **Genes, Brain and Behaviour**, v. 6, p. 192-200, 2007.
- MILLER, B. H., et al. Phenotypic characterization of a genetically diverse panel of mice for behaviour despair and anxiety. **PLoS ONE**, v. 5, n. 12, e14458, 2010.
- MINEUR, Y. S.; BELZUNG, C.; CRUSIO W. E. Effects of unpredictable chronic mild stress on anxiety and depression-like behavior in mice. **Behavioral Brain Research**, v. 175, p. 43-50, 2006.
- MOISAN, M. P.; RAMOS, A. Rat genomics applied to psychiatric research. **Methods Molecular Biology**, v. 597, p. 357-88, 2010.
- MORAES, C. L. K.; BERTOGLIO, L. J.; CAROBREZ, A. P. Interplay between glutamate and serotonin within the dorsal periaqueductal gray modulates anxiety-related behavior of rats exposed to the elevated plus-maze. **Behavioural Brain Research**, v.194, n. 2, p. 181–186, 2008.
- MOZHUI, K. et al., Strain differences in stress responsivity are associated with divergent amygdala gene expression and glutamate-mediated neuronal excitability. **The Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 15, p. 5357-5367, 2010.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Institute for Laboratory Animal Research, Division on Earth and Life Studies. **Guide for the care and use of laboratory animals**. 8th Edition. The National Academic Press: Washington, DC, 2009.
- NESHER, E. et al. Comparative analysis of the behavioral and biomolecular parameters of four mouse strains. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 46, p. 276-284, 2012.
- NISHIKAWA, H. et al. A role for corticotropin-releasing factor in repeated cold stress-induced anxiety-like behavior during forced

- swimming and elevated plus-maze tests in mice. **Biological pharmaceutical bulletin**, v. 27, n. 3, p. 352-356, 2004.
- OLFF, M.; LANGE LAND, W.; GERSONS, B.P. The psychobiology of PTSD: Coping with trauma. **Psychoneuroendocrinology**, v.30, p. 974-982, 2005.
- PAPP, M.; KLIMEK, V.; WILLNER, P. Parallel changes in dopamine D2 receptor binding in limbic forebrain associated with chronic mild stress-induced anhedonia and its reversal by imipramine. **Psychopharmacology (Berl)**. v.115, n. 4, p. 441-6, 1994.
- PAULY, J. R.; ULLMAN, E. A.; COLLINS, A. C. Strain differences in adrenalectomy-induced alterations in nicotine sensitivity in the mouse. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 35, p. 171-179, 1990.
- PAYLOR, R.; CRAWLEY, J. N. Inbred strain differences in prepulse inhibition of the mouse startle response. **Psychopharmacology**, v. 132, p. 169-180, 1997.
- PLAPPERT, C. F.; PILZ, P. K. D. Difference in anxiety and sensitization of acoustic startle response between the two inbred mouse strain BALB/cAN and DBA/2N. **Genes, Brain and Behavior**, v. 1, p. 178-186, 2002.
- PLAPPERT, C. F.; RODEBÜCHER, A. M.; PILZ, P. K. D. Effects of sex and estrous cycle on modulation of the acoustic startle response in mice. **Physiology and Behavior**, v. 84, p. 585-594, 2005.
- RICE, M. C.; O'BRIEN, S. J. Genetic variance of laboratory outbred Swiss mice. **Nature**, v. 283, p. 157-161, 1980.
- RITCHER, S. H. et al. Effect of population heterogenization on the reproducibility of mouse behaviour: a multi-laboratory study. **PLoS ONE**, v. 6, n. 1, e. 16461, 2011.
- ROMEO, E. D. et al., The influence of puberty on stress reactivity and forebrain glucocorticoid receptor levels in inbred and outbred strains of male and female mice. **Psychoneuroendocrinology** (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.psyneuen.2012.07.019>
- RUSSO, S. J. et al. Neurobiology of resilience. **Nature Neuroscience Reviews**, v. 15, n. 11, p. 1475-1484, 2012.
- SANTOS, E. C. S. **Investigação da atividade neurofarmacológica de *Illex paraguariensis* em camundongos**. 2011. 107 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

- SCHMID, A.; KOCH, M.; SCHNITZLER, H. U. Conditionated pleasure attenuates the startle response in rats. **Neurobiology of learning and memory**, v. 64, p. 1-3, 1995.
- SEEMAN, M. V. Psychopatology in women and men: focus on female hormones. **The American Journal of Psychiatry**, v. 164, p. 1641-1647, 1997.
- SILVA, C. F. **Condições de alojamento: Influência no comportamento, na neurogênese do hipocampo e no efeito de drogas padrão em camundongos Swiss adultos**. 2011. 111 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- SILVA, T. P. **Alterações comportamentais, neuroquímicas e neuroimunológicas induzidas por lesão estriatal com 6-OHDA**. 2012. 49 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- SILVEIRA, M. C. L.; SANDNER, G.; GRAEFF, F. G. Induction of Fos immunoreactivity in the brain by exposure to the elevated plus-maze. **Behavioural Brain Research**, v. 56, n. 1, p. 115–118, 1993.
- SLATTERY, D.A.; MARKOU, A.; CRYAN, J.F. Evaluation of reward processes in an animal model of depression. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 190, p. 555-568, 2007.
- STAMFORD, J. A. et al. Voltammetric evidence that subsensitivity to reward following chronic mild stress is associated with increased release of mesolimbic dopamine. **Psychopharmacology (Berl)**, v.105, n. 2, p. 275-82, 1991
- STERN, C. A. J. et al. Activity in prelimbic cortex is required for adjusting the anxiety response level during the elevated plus-maze retest. **Neuroscience**, v. 170, n. 1, p. 214–222, 2010.
- SZABO, I. Analysis of the muscular action potentials accompanying the acoustic startle reaction. **Acta Physica Academiae Scientiarum Hungarica**, v. 27, p. 167-178, 1965.
- SZKLARCZYK, K. et al. Genotype-dependent consequences of traumatic stress in four inbred mouse strains. **Genes, Brain and Behavior**, doi: 10.1111/j.1601-183X.2012.00850.x
- TADAIESKY, M. T. et al. Emotional, cognitive and neurochemical alterations in a premotor stage model of Parkinson's disease. **Neuroscience**, v.156, n. 4, p. 830–840, 2008.

- TARANTINO, L. M. et al. Behavior and mutagenesis screens: the importance of baseline analysis of inbred strain. **Mammalian Genome**, v. 11, 555-564, 2000.
- ULRICH-LAI, Y. M.; HERMAN, J. P. Neural regulation of endocrine and autonomic stress response. **Nature Reviews: Neuroscience**, v. 10, p. 397-409, 2009.
- VALSAMIS, B.; SCHMID, S. Habituation and Prepulse Inhibition of Acoustic Startle in Rodents. **Journal of Visualized Experiments**, v. 55, 2011.
- VIANA, M. C.; ANDRADE, L. H. Lifetime prevalence, age and gender distribution and age-of-onset of psychiatric disorders in the São Paulo metropolitan area, Brazil: results from the São Paulo Megacity Mental Health Survey. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 34, p. 249-260, 2012.
- WALKER, D. L.; DAVIS, M. Anxiogenic effects of high illumination levels assessed with the acoustic startle response in rats. **Biological Psychiatry**, v. 42, p. 461-471, 1997.
- WANASUNTRONWONG, A. et al. Anxiolytic effects of standardized extract of *Centella asiatica* (ECa 233) after chronic immobilization stress in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, n. 2, p. 579-585, 2012.
- WILLNER, P. Chronic Mild Stress (CMS) Revisited: Consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. **Neuropsychobiology**, v. 52, p. 90-110, 2005.
- WILLOT, J. F.; CARLSON S. Modification of the acoustic startle response in hearing-impaired C57BL/6J mice: prepulse augmentation and prolongation of prepulse inhibition. **Behavioral Neuroscience**, v. 109, n. 3, p. 396-403, 1995.
- WILLOT, J. F. et al. Acoustic Startle and Prepulse Inhibition in 40 Inbred Strains of Mice. **Behavioral Neuroscience**, v. 117, n. 4, p. 716-727, 2003.
- XIAO-LEI, A. N. et al. Strain and sex differences in anxiety-like and social behaviours in C57BL/6J and BALB/cJ mice. **Experimental Animals**, v. 60, n. 2, p. 111-123, 2011.
- YALSIN, I.; BELZUNG, C.; SURGET, A. Mouse strain differences in unpredictable chronic mild stress: a four-antidepressant survey. **Behavioral Brain Research**, v. 193, p. 140-143, 2008.